

GESAMTGENOMSCAN BEI NICHT VERWANDTEN WARMBLUTPFERDEN MIT CHRONISCH OBSTRUKTIVER BRONCHIOLITIS

CAROLIN EHRMANN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Pferde, Innere Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Fey

**Gesamtgenomscan bei nicht verwandten Warmblutpferden
mit chronisch obstruktiver Bronchiolitis**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich für Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Carolin Ehrmann
Tierärztin aus Bretten

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Fey

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Tag der Disputation: 24.05.2012

Für meine Mutter

Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner als
>	größer als
AATD	Alpha 1-Antitrypsin-Defizienz
Abb.	Abbildung
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
ADAM33	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADRB2	Adrenozeptor Beta 2 oder Beta 2 adrenerger Rezeptor
AGER	Advanced Glycosylation End Product-Specific Receptor
AIF1	Allograft Inflammatory Factor 1
ARMC2	Armadillo Repeat Containing 2
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BC Gene	Biocomputing Gene
BGA	Blutgasanalyse
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
CB	Chronische Bronchitis
CCDD38	Coiled-Coil Domain Containing 38
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungscluster)
CDC123	Cell Division Cycle 123 homolog
CFDP1	Craniofacial Development Protein 1
CH	Schweiz
CHRNA 3/5	Alpha-Nicotin-Acetylcholin-Rezeptor 3/5
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COB	Chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
C10orf11	Chromosome 10 open reading frame
D	Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

Δp_{plmax}	Maximale Interpleuraldruckdifferenz
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic Acid ("Desoxyribonukleinsäure")
\$	US-Dollar
DQB1	Humanes Leukozyten Antigen Klasse II, DQ
DRB1	Humanes Leukozyten Antigen Klasse II, DR
E	Extinktion
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Ethylendiamintetressigsäure)
EHV	Equines Herpesvirus
EMP2	Empirischer p-Wert
EVA	Equine Virus Arteritis
evtl.	eventuell
F	Frankreich
FAM13A	Family with Sequence Similarity 13 Member A1
FEF	Forced Expiratory Flow
FEV ₁	Forced Expiratory Volume 1 Sekunde (Einsekundenkapazität)
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
FVC	Forced Vital Capacity
ggr.	geringgradig
GINA	Global Initiative for Asthma
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease
GPR126	G Protein gekoppelter Rezeptor 126
GSDMB	Gasdermin B
GSTCD	Glutathion S-Transferase C-Terminal Domain Containing
GSTM1	Glutathion S-Transferase M 1
GSTP1	Glutathion S-Transferase P 1
GSTT1	Glutathion S-Transferase-Theta 1
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h ²	Heritabilität
HDAC4	Histone Deacetylase 4
hgr.	hochgradig
HHIP	Hedgehog Interacting Protein
HLA-DQ	Major Histokompatibilitätskomplex Klasse II DQ
HOARSI	Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index

Abkürzungsverzeichnis

HTR4	5-Hydroxytryptamin Rezeptor 4
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium (Hardy-Weinberg-Äquilibrium)
IAD	Inflammatory Airway Disease
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL1RL1	Interleukin1 Rezeptor Like 1
IL2RB	Interleukin 2 Rezeptor Beta
IL4R	Interleukin 4 Rezeptor
IL7R	Interleukin 7 Rezeptor
IL18R1	Interleukin 18 Rezeptor 1
IL21R	Interleukin 21 Rezeptor
IREB2	Iron Regulator Protein 2
JLU	Justus-Liebig-Universität
Kap.	Kapitel
KCNE2	Potassium Voltage-Gated Channel, Isk-related Family, Member 2
KWPN	Koninklijk Warmbloed Paard Nederland
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LFS	Lavender Foal Syndrom
LINC00310	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 310
-log10	Negativer dekadischer Logarithmus
LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
MAF	Minorallelfrequenz
Max MAF	Maximale Minorallelfrequenz
Mb	Megabasen
MDS	Multidimensionale Skalierung
MECOM (EVI1)	MDS1 and EVI1 Complex Locus
MFAP2	Microfibrillar-Associated Protein 2
mgr.	mittelgradig
MHC	Major Histocompatibility Complex
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber
MMP	Matrix-Metalloproteinase

Abkürzungsverzeichnis

MYO5A	Myosin Va
n	Anzahl
NCR3	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3
NE	Neutrophile Elastase
NF-κB	Nuclear Factor κB
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NOS1	Nitric Oxide Synthase 1
OCD	Osteochondrosis dissecans
ORMDL3	Mitglied einer Genfamilie die Transmembranproteine kodiert, welche am endoplasmatische Retikulum verankert sind
p	Wahrscheinlichkeit
PDE4D	Phosphodiesterase 4 D
PPT2	Palmitoyl-Protein Thioesterase 2
PTGER4	Prostaglandin E-Rezeptor
QTL	Quantitative Trait Locus
RAO	Recurrent Airway Obstruction
RARB	Retinoic Acid Receptor Beta
RHOBTB3	Rho-related BTB Domain Containing 3
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RR	Relatives Risiko
RSQ	Risk Screening Questionnaire
S.	Seite
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SLPI	Secretory Leukoprotease Inhibitor (Antileukoproteinase)
SMAD3	SMAD Family Member 3
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sog.	sogenannt
SPATA9	Spermatogenesis Associated 9
SPINK5	Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5
STR	Short Tandem Repeats
s.u.	siehe unten

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
TGFB2	Transforming Growth Factor Beta 2
TH1	Lymphozyt vom Typ Helfer-1
TH2	Lymphozyt vom Typ Helfer-2
TH17	Lymphozyt vom Typ Helfer-17
THSD4	Thrombospondin Type I Domain Containing 4
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNS1	Tensin 1
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZKSCAN3	Zinc Finger with KRAB and SCAN Domains 3
ZVCH	Zuchtverband des Schweizer Warmblut-Sportpferdes

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I-V
Inhaltsverzeichnis	VI-IX
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 ZUM HUMANEN ASTHMA	3
2.1.1 Definition des Asthma bronchiale	3
2.1.2 Klinisches Bild, auslösende Faktoren und Prävalenz des Asthmas	4
2.1.3 Pathomechanismen des Asthmas und immunologische Hintergründe	5
2.1.4 Genetische Untersuchungen	6
2.2 ZUR CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)	8
2.2.1 Definition der Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)	8
2.2.2 Klinisches Bild, auslösende Faktoren und Prävalenz der COPD	8
2.2.3 Pathomechanismen der COPD und immunologische Hintergründe	10
2.2.4 Genetische Untersuchungen	12
2.3 ZUR EQUINEN CHRONISCH OBSTRUKTIVEN BRONCHI(OLI)TIS (COB)	16
2.3.1 Definition COB/RAO/Heaves	16
2.3.2 Inflammatory Airway Disease (IAD)	18
2.3.3 Klinisches Bild, auslösende Faktoren und Prävalenz der COB	18
2.3.4 Pathomechanismen der COB und immunologische Hintergründe	20
2.3.5 Vergleich der equinen COB mit dem humanen Asthma und der COPD	23
2.3.5.1 Gemeinsamkeiten der equinen COB mit dem humanen Asthma	23

Inhaltsverzeichnis

2.3.5.2 Gemeinsamkeiten der equinen COB mit der humanen COPD	24
2.3.6 Genetische Untersuchungen	24
2.3.7 Fragebogen zur Untersuchung der equinen COB	29
2.4 GRUNDLAGEN ZUR GENETISCHEN ANALYTIK	30
2.4.1 Genotyp und Phänotyp	31
2.4.2 Genetische Marker	31
2.4.3 DNA-Polymorphismus	32
2.4.4 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	32
2.4.5 Gesamtgenomscan	34
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
3.1 MATERIAL	37
3.1.1 Patienten	37
3.1.1.1 Einschlusskriterien	37
3.1.1.2 Standardisierter Fragebogen (HOARSI)	37
3.1.1.3 Auswertung von HOARSI Informationen	39
3.1.1.4 Klinische Untersuchung	43
3.1.1.5 Blutprobenentnahme	43
3.1.1.6 Blutprobenverarbeitung und –lagerung	44
3.2 METHODEN	45
3.2.1 Isolierung von DNA aus EDTA-Blut	45
3.2.2 SNP-Chip-Untersuchung (Illumina SNP50 Genotyping Bead Chip)	46
3.2.3 Multidimensionale Skalierungen (MDS-Plots)	47
3.2.4 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)	47

Inhaltsverzeichnis

3.2.4.1 Auswahl der Phänotypen für die GWAS	48
3.2.4.2 Berechnung und Darstellung der GWAS	49
3.2.4.3 Interne Kontrolle der GWAS: Assoziationsberechnung zur Fuchsfarbe	50
3.3 ERGEBNISSE	51
3.3.1 Patientendaten und Gruppenvergleich	51
3.3.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchung	53
3.3.3 Ergebnisse der multidimensionalen Skalierungen (MDS-Plots)	54
3.3.4 Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudien (GWAS)	56
3.3.5 Ergebnisse der internen Kontrolle: GWAS Fuchsfarbe	63
4 DISKUSSION	65
4.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN	65
4.1.1 Diskussion der Einschlusskriterien	65
4.1.2 Diskussion des standardisierten Fragebogens	67
4.1.2.1 Validität des standardisierten Fragebogens	67
4.1.2.2 Datenerhebung anhand des standardisierten Fragebogens	69
4.1.2.3 Bewertung der Besitzerangaben durch Score-Punkte	70
4.1.2.4 HOARSI	74
4.1.3 Diskussion der klinischen Untersuchung	76
4.1.4 Diskussion der SNP-Chip-Untersuchung	77
4.1.5 Diskussion der Methodik der multidimensionalen Skalierungen	78
4.1.6 Diskussion der Methodik der genomweiten Assoziationsstudien	79
4.1.7 Diskussion zur Berechnung der Power von genetischen Untersuchungen	80

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	83
4.2.1 Diskussion der Patientendaten	83
4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der multidimensionalen Skalierungen	86
4.2.3 Diskussion der der Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudien	89
5 SCHLUSSFOLGERUNGEN	96
6 ZUSAMMENFASSUNG	97
7 SUMMARY	99
8 LITERATURVERZEICHNIS	101
9 ANHANG	115
9.1 TABELLENVERZEICHNIS	115
9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
9.3 DATENVERZEICHNIS	117

1 EINLEITUNG

Die equine chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis (COB) ist eine multifaktorielle und polygenetisch bedingte Krankheit. Sie stellt die häufigste nicht infektiöse Erkrankung des Respirationstraktes erwachsener Pferde in unseren Breiten dar. Auslösende Faktoren sind in erster Linie organische Staubpartikel im Heu und in der Einstreu, die Schimmelpilze und ihre Sporen enthalten. Auffällig ist, dass unter gleichen Haltungsbedingungen nur „empfindliche“ Individuen erkranken. Die der COB zugrunde liegenden Pathomechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt und es ist bisher nur wenig über die an der Pathogenese beteiligten Gene bekannt.

In der Humanmedizin sind für das Asthma und die COPD bereits einige der beteiligten Gene identifiziert worden. Ebenso wie bei der equinen COB handelt es sich dabei um komplexe, chronisch entzündliche Erkrankungen des Respirationstraktes, die in genetisch prädisponierten Individuen durch die Einwirkung von Umweltfaktoren ausgelöst werden.

Für die equine COB konnte eine genetische Prädisposition durch zahlreiche Nachweise familiärer Häufung belegt werden (SCHÄPER 1939; KOCH 1957; MARTI et al. 1991; RAMSEYER et al. 2007). Genetische Untersuchungen der Schweizer Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Vincent Gerber zeigten bei den Nachkommen einer Schweizer Hengstfamilie in einer Kandidatengenanalyse eine Assoziation des Interleukin-4-Rezeptor alpha-Gens zur COB (JOST et al. 2007). Durch einen Gesamtgenomscan mit 250 Mikrosatellitenmarkern konnten 2009 bei den Nachkommen zweier Schweizer Hengste zwei QTLs für COB nachgewiesen werden, zum einen auf Chromosom 13 für die eine Hengstfamilie und zum anderen auf Chromosom 15 für die andere Familie (SWINBURNE et al. 2009). Die Ergebnisse dieser Familienstudien sprechen für eine genetische Heterogenität bei der Vererbung der COB. Es ist wahrscheinlich, dass zahlreiche Genloci an der Ausprägung einer COB beteiligt sind (SWINBURNE et al. 2009).

Durch große Fortschritte in der Pferdegenetik in den letzten Jahren stehen seit Kurzem moderne molekulargenetische Methoden wie z.B. SNP-Chips zur Untersuchung komplexer genetisch bedingter Erkrankungen für das Pferd zur Verfügung. 2007 wurde die Sequenzierung des gesamten Pferdegenoms abgeschlossen und im Zuge dessen wurde 2008 der erste SNP-Chip für das Pferd

Einleitung

von Illumina® (San Diego, USA) auf den Markt gebracht. Dieser EquineSNP50 Genotyping BeadChip bietet die Möglichkeit 54.602 SNPs gleichzeitig zu genotypisieren. Durch das Identifizieren solcher genetischer Marker für die COB wäre es möglich, prädisponierte Individuen zu erkennen und durch selektive Zucht risikoreiche Paarungen zu vermeiden. Das Auffinden von krankheitsassoziierten SNPs würde die gezielte Suche nach pathogenetisch relevanten Genen zur Aufklärung der COB-Pathogenese ermöglichen.

So bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, durch einen Gesamtgenomscan mit 54.602 SNPs bei nicht verwandten Warmblutpferden in einer Fall-Kontroll-Studie mit der chronisch obstruktiven Bronchiolitis assoziierte SNPs zu identifizieren.

2 LITERATURÜBERSICHT

Für das humane Asthma sowie für die humane COPD konnten bereits krankheitsassoziierte Genvarianten durch genomweite Assoziationsstudien aufgedeckt werden. Beide stellen polygenetisch bedingte, chronische Atemwegserkrankungen dar, welche pathophysiologisch mit der equinen COB vergleichbar sind. Daher wird im Folgenden auf das humane Asthma sowie auf die humane COPD und auf die equine COB eingegangen.

2.1 ZUM HUMANEN ASTHMA

2.1.1 Definition des Asthma bronchiale

Nach dem neuesten Update der „Global Strategy for Asthma Management and Prevention“ im Dezember 2011 durch die Global Initiative for Asthma (GINA, <http://www.ginasthma.com>) gilt aktuell folgende überwiegend deskriptive Definition für das Asthma bronchiale des Menschen:

„Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways in which many cells and cellular elements play a role. The chronic inflammation is associated with airway hyperresponsiveness that leads to recurrent episodes of wheezing, breathlessness, chest tightness, and coughing, particularly at night or in the early morning. These episodes are usually associated with widespread, but variable, airflow obstruction within the lung that is often reversible either spontaneously or with treatment.“

„Asthma ist eine chronische entzündliche Veränderung der Atemwege, an der viele verschiedene Zellen und Zellbestandteile beteiligt sind. Die chronische Entzündung ist mit einer Atemwegshyperreagibilität assoziiert, die wiederum zu wiederkehrenden Episoden mit heftigen Atemgeräuschen, Kurzatmigkeit, Brustenge und Husten führt, insbesondere nachts oder in den frühen Morgenstunden. Diese Episoden sind gewöhnlich mit einer umfassenden, in ihrem Ausmaß aber variablen Atemwegsobstruktion in der Lunge vergesellschaftet, die sich meist spontan oder unter Therapie als reversibel erweist.“ (Übersetzung der Autorin).

2.1.2 Klinisches Bild, auslösende Faktoren und Prävalenz des Asthmas

Asthma ist eine komplexe Erkrankung, deren Auftreten durch ein kompliziertes Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen bestimmt wird (VON MUTIUS 2009). Die Krankheit zeigt eine hohe phänotypische Heterogenität (SLEIMAN und HAKONARSON 2010). Wiederkehrende, variable Episoden von Kurzatmigkeit (vor allem in der Nacht), Brustenge, hiemende Atemgeräusche und Husten charakterisieren das klinische Bild. Betroffen sind vor allem Kinder und jüngere Menschen (GINA 2011).

Risikofaktoren für die Asthmaentstehung können unterteilt werden in solche die das Asthma verursachen und solche, die die Symptome triggern, wobei manche Faktoren für beides verantwortlich sind. Erstere schließen Wirtsfaktoren ein, welche überwiegend genetisch bedingt sind, letztere sind meist Umweltfaktoren (GINA 2011). Man unterscheidet das allergisch bedingte vom nicht-allergischen Asthma, wobei häufig Mischformen auftreten. Im Kindesalter ist das allergische Asthma deutlich häufiger und macht ca. 90% aller Asthmaformen aus. Beim allergischen Asthma wird nach einer Exposition des Patienten gegenüber äußeren Reizen (Allergenen) eine IgE-vermittelte allergische Sofortreaktion vom Typ I ausgelöst. Diese ist oft auf eine genetische Disposition des Individuums im Sinne einer Atopie zurückzuführen. Inhalationsantigene wie Pollen, Faeces von Hausstaubmilben, Tierepithelien, Mehlstäube und Schimmelpilzsporen sind in diesem Zusammenhang am häufigsten verantwortlich (FALK 2007). Im Gegensatz dazu manifestiert sich das nicht-allergische Asthma meist im Anschluss an eine respiratorische Infektion. Weitere Faktoren können unspezifische physikalisch-chemische Reize sein, kalte und trockene Luft, besondere körperliche Anstrengung oder psychischer Stress. Desweiteren können Medikamentenunverträglichkeiten das asthmatische Geschehen verursachen (FALK 2007).

Asthma stellt ein globales Problem mit geschätzt 300 Millionen betroffenen Menschen dar. Die Asthmaprävalenz liegt zwischen 1-18% (GINA 2011). Weltweit zeigen sich deutliche Unterschiede in der Prävalenz, selbst in genetisch ähnlichen Gruppierungen, was den großen Einfluss von Umweltfaktoren auf das Asthma ersichtlich macht. So können Luftschadstoffe erwiesenermaßen bei bestehendem Asthma eine Exazerbation auslösen, andererseits kann die Einwirkung von

Schadgasen zur Asthmaentstehung beitragen (LONDON 2007). Industrieländer weisen insgesamt eine höhere Asthmaprävalenz auf (LAI et al. 2009) und das Asthma zählt hier zur häufigsten chronischen Erkrankung bei Kindern (SLEIMAN und HAKONARSON 2010).

2.1.3 Pathomechanismen des Asthmas und immunologische Hintergründe

Chronisch entzündliche Prozesse an den Atemwegen und eine Atemwegshyperreagibilität stellen die dem Asthma bronchiale zugrunde liegenden Pathomechanismen dar. Die Hyperreagibilität auf Stimuli, die für einen „Nichtasthmatiker“ ungefährlich sind charakterisiert die funktionelle Anomalie des Asthmas. Die Entzündung persistiert auch wenn die Symptomatik episodisch auftritt. Der gesamte Respirationstrakt kann von der entzündlichen Reaktion betroffen sein, am ausgeprägtesten sind die Effekte aber an den mittelgroßen Bronchien (GINA 2011).

Die Entzündung ist dominiert von aktivierten Mastzellen, einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten und TH2-Lymphozyten. Über 100 verschiedene Entzündungsmediatoren sind an der komplexen inflammatorischen Reaktion beteiligt (GINA 2011). Die Überempfindlichkeit auf inhalative Antigene oder auch auf unspezifische Reize führt über einen vagalen Reflex oder indirekt über Mediatorenfreisetzung insbesondere aus Mastzellen (Histamin, Prostaglandin D₂, Leukotriene) und eosinophilen Granulozyten (Leukotriene) zu einer Bronchokonstriktion (EMPEY et al. 1976). Die Freisetzung spezifischer Zytokine wie Interleukin (IL-) 4, IL-5, IL-9 und IL-13 aus TH2-Lymphozyten steuert die Eosinophilie und die IgE-Produktion in B-Zellen. Als weiterer T-Zell-Subtyp sind wahrscheinlich TH17-Zellen durch Produktion von IL-17 an der Anlockung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege beteiligt (NAKAE et al. 2007; PENE et al. 2008; WAKASHIN et al. 2008; MURPHY und O'BYRNE 2010). Bei schweren Formen des Asthmas und bei rauchenden Asthmatikern zeigt sich neben den Eosinophilen eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen und im Sputum (GINA 2011). Durch die anhaltende bzw. wiederkehrende Entzündung kommt es zu strukturellen Veränderungen von Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Gefäßen, dem sogenannten Remodeling der tiefen Atemwege (MURPHY und O'BYRNE 2010).

2.1.4 Genetische Untersuchungen

Anfang des 19. Jahrhunderts konnte erstmals durch den Nachweis familiärer Häufung der genetische Einfluss bei der Asthmaentstehung bewiesen werden (COOKE und VANDER VEER 1916; SPAIN und COOKE 1924; LOS et al. 2001). Seither wurden mehr als 100 Kandidatengene für Asthma durch Assoziationsstudien nachgewiesen. Über die Genprodukte dieser Kandidatengene lässt sich eine Verbindung zu den bisher bekannten Pathomechanismen herstellen. Nach einem Review von SLEIMANN und HAKONARSON (2010) sind als wichtigste Kandidatengene diejenigen zu nennen, welche Einfluss auf folgende Mechanismen haben:

- Angeborene Abwehr: z.B. Toll-Like-Rezeptoren, Cluster of Differentiation 14
- Entzündungskaskaden: z.B. Chemokine und Zytokine
- Lungenfunktion, Wachstum und Entwicklung: z.B. Transforming Growth Factor beta 1 (TGF-beta1), Adrenozeptor beta 2 (ADRB2), Nitric Oxide Synthase 1, 3 Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5
- Reaktion auf Umwelteinwirkungen wie Abgase oder Zigarettenrauch: z.B. Glutathion S-Transferase M 1 (GSTM1), GSTP1, GSTT1

Nur wenige dieser Kandidaten, wie das ADRB2-Gen und Gene, die in die IL-4/IL-13 Signalkaskade einbezogen sind, konnte bisher einheitlich in verschiedenen Population bestätigt werden (SLEIMAN und HAKONARSON 2010).

Mitte 2007 wurde in der ersten genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) an britischen und deutschen Kindern eine Assoziation von Kinderasthma mit dem ORMDL3-Gen auf Chromosom 17 nachgewiesen. Das ORMDL3-Gen ist Mitglied einer Genfamilie die Transmembranproteine kodiert, welche am endoplasmatischen Retikulum verankert sind (MOFFATT et al. 2007). Die Assoziation des ORMDL3-Gens zu Asthma zeigte auch in weiteren ethnisch unterschiedlichen Populationen wie Mexikanern, Portorikanern und Afroamerikanern (SLEIMAN et al. 2008; GALANTER et al. 2008) sowie bei Nordamerikanern (SLEIMAN et al. 2008) eine Reproduzierbarkeit.

Literaturübersicht

2009 wurden in weiteren GWAS Assoziationen von Asthma zum Interleukin-1 Rezeptor-Like-1-Gen (IL1RL1) (GUDBJARTSSON et al. 2009) und zum Phosphodiesterase 4D-Gen (PDE4D) (HIMES et al. 2009) in mehreren Populationen nachgewiesen. PDE4D ist ein sehr viel versprechendes Kandidatengen, da seine Genprodukte in die Regulation der Kontraktilität der Atemmuskulatur einbezogen sind. Phosphodiesterase-Inhibitoren wie der selektive PDE4-Hemmer Roflumilast wurden bereits zur Asthmabehandlung entwickelt (HIMES et al. 2009).

In die größte bisher veröffentlichte GWAS für Asthma durch das GABRIEL Consortium (2010) wurden über 26.000 Menschen, davon etwa 10.000 Asthmatiker und 16.000 Kontrollen, einbezogen. Das bedeutet eine etwa 10-fach höhere Probandenanzahl im Vergleich zu anderen GWAS bei Asthma und eine entsprechend höhere Power der Studie. Dabei wurden sechs Genloci mit genomweit signifikanter Assoziation zu Asthma identifiziert (MOFFATT et al. 2010). Diese sechs Loci sind in Tab. 1 aufgeführt und werden zu den überzeugendsten genetischen Risikofaktoren für Asthma gezählt (FERREIRA et al. 2011). Die Aufdeckung der kausalen Mechanismen hinter diesen Assoziationen wird wahrscheinlich bedeutende Erkenntnisse über die Asthma-Pathogenese liefern (AKHABIR und SANDFORD 2011).

Tab. 1: Genloci mit genomweit signifikanter Assoziation zu Asthma aus GABRIEL Consortium (MOFFATT et al. 2010):

Genlocus	Chromosom	SNP	p
IL1RL1/IL18R1	2	rs3771166	3×10^{-9}
HLA-DQ	6	rs9273349	7×10^{-14}
IL33	9	rs1342326	9×10^{-10}
SMAD3	15	rs744910	4×10^{-9}
ORMDL3/GSDMB	17	Rs2305480	6×10^{-23}
IL2RB	22	rs2284033	$1,1 \times 10^{-8}$

Asthma ist eine komplexe Erkrankung, zu deren Entstehung zahlreiche Gene mit relativ geringem Einzeleinfluss anstelle weniger Hauptgene beitragen. Die zusätzliche Schwierigkeit bei der Aufklärung der Asthma-Genetik stellt die Variabilität der auslösenden Umwelteinflüsse dar. Das Einbeziehen von Gen-Umweltwechselwirkungen in GWAS könnte das Verständnis der Asthma-Ätiologie in Bezug auf die genetischen Faktoren als auch auf die Umweltfaktoren verbessern (WEISS und SILVERMAN 2011).

2.2 ZUR CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD)

2.2.1 Definition der Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Die Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD, <http://www.goldcopd.com>), definiert die humane COPD in der bislang letzten Aktualisierung von 2011 folgendermaßen:

„Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), a common preventable and treatable disease, is characterized by persistent airflow limitation that is usually progressive and associated with an enhanced chronic inflammatory response in the airways and the lung to noxious particles or gases. Exacerbations and comorbidities contribute to the overall severity in individual patients.“

„Die COPD, eine vermeidbare und behandelbare Erkrankung, ist durch eine anhaltende Atemflussminderung charakterisiert, welche in der Regel progressiv verläuft und mit einer gesteigerten chronisch entzündlichen Antwort der Atemwege und der Lunge auf schädliche Partikel oder Gase verbunden ist. Exazerbationen und extrapulmonale Begleiterkrankungen tragen insgesamt zu ihrem individuellen Schweregrad bei.“ (Übersetzung der Autorin).

2.2.2 Klinisches Bild, auslösende Faktoren und Prävalenz der COPD

Die COPD ist eine weitverbreitete, komplexe Erkrankung, die in genetisch prädisponierten Individuen durch die Einwirkung schädlicher Noxen, vor allem Zigarettenrauch, entsteht (GOLD 2011).

Literaturübersicht

Im Vordergrund der Erkrankung steht eine chronische Atemflussminderung. Die charakteristischen klinischen Symptome sind chronische, fortschreitende Dyspnoe, Husten und starke Schleimproduktion. Die COPD kann zudem deutliche extrapulmonale Auswirkungen wie Gewichtsverlust, Störung der Nährstoffaufnahme oder Funktionsstörung der Skelettmuskulatur haben. COPD-Patienten zeigen ein erhöhtes Risiko einen Herzinfarkt, Angina pectoris (Brustenge), Osteoporose, respiratorische Infekte, Frakturen, Depressionen, Diabetes, Schlafstörungen, eine Anämie oder ein Glaukom zu entwickeln (GOLD 2011).

Anhand spirometrischer Messung des Ein-Sekunden-Volumens FEV1 (Forced Expiratory Volume einer Sekunde) und der Berechnung des Quotienten von FEV1 zur forcierten Vitalkapazität FVC (Forced Vital Capacity) erfolgt eine Einteilung der COPD-Betroffenen in vier Schweregrade: mild (I), mäßig (II), schwer (III) und sehr schwer (IV) (GOLD 2011).

Die COPD ist eine progressive Erkrankung, vor allem wenn die Aufnahme schädlicher Gase fortgesetzt wird. Wird die Exposition gestoppt kann dies zu einer Verbesserung der Lungenfunktion führen und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen aber meist nicht aufhalten. Die COPD kann nicht geheilt werden und bedarf oft bereits ab Grad II einer kontinuierlichen Behandlung um die Lebensqualität zu erhöhen bzw. um Symptome, Exazerbationen und die Sterblichkeit zu vermindern (GOLD 2011). Das Zigaretten-Rauchen stellt weltweit den größten Risikofaktor für die COPD dar, in Entwicklungsländern kommt direkte Schadgaswirkung durch das Verbrennen von Holz oder anderen Biobrennstoffen an offenen Feuerstellen zum Kochen und Heizen hinzu (GOLD 2011).

Die Angaben zur Prävalenz weichen aufgrund unterschiedlicher diagnostischer Kriterien und analytischer Verfahren sowie mangelndem Bewusstsein für die Erkrankungsmanifestation stark voneinander ab und liegen in der Regel falsch zu niedrig (CHAPMAN et al. 2006). Die COPD prägt sich hauptsächlich bei mittelalten Langzeitrauchern aus (GOLD 2011). Mit zunehmendem Alter steigt die COPD-Prävalenz steil an. Sie liegt Schätzungen zufolge in der allgemeinen Bevölkerung über alle Altersklassen verteilt bei etwa 1% und zeigt einen Anstieg auf weit über 10% bei den über 40-Jährigen (CHAPMAN et al. 2006). 1990 war die COPD die

sechst häufigste Todesursache weltweit und wird 2020 wahrscheinlich die dritt häufigste sein (GOLD 2011).

2.2.3 Pathomechanismen der COPD und immunologische Hintergründe

Im Zentrum der COPD-Pathogenese steht eine Entzündungsreaktion in der Lunge, welche eine Bronchialobstruktion, strukturelle Veränderungen und eine mukoziliäre Dysfunktion induziert (VOGELMEIER et al. 2006). Die Inhalation von Zigarettenrauch oder anderen schädlichen Partikel ruft in empfänglichen Individuen eine übermäßige entzündliche Reaktion der Atemwege hervor. Diese kann zur Vernichtung von Lungenparenchym führen und die normalen Reparatur- und Abwehrmechanismen zum Erliegen bringen (GOLD 2011).

Die chronische Entzündung ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Anzahl an spezifischen Entzündungszellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (BARNES et al. 2003). Inhalierte Noxen führen zu einer Aktivierung von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen mit folgender Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha), IL-8, Leukotrien B4 und reaktiven Sauerstoffmetaboliten. Diese Mediatorenfreisetzung bedingt den Einstrom von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe. Es wird vermutet, dass durch den Zigarettenrauch selbst Atemwegszellen beschädigt oder neue Autoantigene erzeugt werden, die eine inflammatorische Antwort hervorrufen (VOGELMEIER et al. 2006).

Makrophagen treten in stark erhöhter Anzahl im Atemwegslumen und im Lungenparenchym auf. Im Lungengewebe und in den Atemwegswänden sind sowohl CD8 positive als auch CD4 positiven T-Lymphozyten erhöht. CD8 positive Lymphozyten können durch ihre zytotoxische Wirkung Alveolarzellen zerstören. Aktivierte neutrophile Granulozyten finden sich vermehrt im Sputum und in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von COPD-Patienten (KEATINGS et al. 1996) jedoch nicht im Lungengewebe, was wahrscheinlich auf eine schnelle Wanderung der Neutrophilen durch Bronchien und Lungenparenchym in die luftführenden Wege zurückzuführen ist (SELBY und MacNEE 1993; MacNEE 2005). Die Freisetzung von Serinproteasen wie neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G,

Literaturübersicht

Proteinase-3 und Matrix-Metalloproteinase (MMP) -8 und MMP-9 aus neutrophilen Granulozyten kann zur alveolären Destruktion beitragen. Zudem stimulieren diese Serinproteasen in starkem Maß die Mukussekretion (BARNES et al. 2003).

Oxidativer Stress durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch inhalierte Schadgase oder aus aktivierten Entzündungszellen führt in COPD-Patienten zur gesteigerten Expression von Entzündungsgenen. Aus der Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie z.B. Nuclear Factor- κ B und Activating Protein-1 sowie der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie IL-8 resultiert eine Steigerung der Entzündung (VOGELMEIER et al. 2006). Reaktive Sauerstoffmetabolite stimulieren die Mukusproduktion, führen zu einer Verschlechterung der mukoziliären Clearance und begünstigen somit eine Schleimansammlung (VOGELMEIER et al. 2006). Als Reaktion auf die anhaltende Irritation der Atemwege kommt es zu einer erhöhten Anzahl an Becherzellen (GOLD 2011). Sauerstoffradikale bewirken darüber hinaus eine gesteigerte Exsudation von Plasma in das Gewebe als Folge einer erhöhten Permeabilität des Epithels und eine Bronchokonstriktion (MacNEE 2005).

Ein kausaler Zusammenhang scheint bei COPD-Patienten auch zwischen reaktiven Sauerstoffmetaboliten und dem Ungleichgewicht von Proteasen, die Bindegewebsanteile auflösen und Antiproteasen, die dagegen schützen zu bestehen. Die wichtigsten Antiproteasen der menschlichen Lunge, das α 1-Antitrypsin und die Antileukoprotease (Secretory Leukoprotease Inhibitor, SLPI), lassen sich durch Oxidation zumindest partiell inaktivieren (VOGELMEIER et al. 1997). Die Zerstörung von Elastin, einem Bindegewebsanteil des Lungenparenchyms trägt mit zur Entstehung eines Lungenemphysems bei (GOLD 2011).

Durch die entzündliche Schleimhautschwellung kommt es zu einer starken Einengung der kleinen Atemwege (BARNES et al. 2003) und zudem kann die Einlagerung von Kollagen die Ausdehnung einschränken (HOGG et al. 2004).

Die Fibrosierung der kleinen Atemwege stellt vermutlich einen Versuch dar die Auswirkungen der chronischen Entzündung zu reparieren. Wachstumsfaktoren wie z.B. Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) zeigen eine erhöhte Expression in den peripheren Atemwegen (TAKIZAWA et al. 2001). TGF-beta kann durch Freisetzung von Connective Tissue Growth Factor (CTGF), welches die Kollageneinlagerung in die Atemwege anregt, eine Fibrose induzieren (IHN 2002).

Bei einer Exazerbation kommt es zu einer weiteren dramatischen Verschlimmerung der Entzündung in den Atemwegen, welche durch virale oder bakterielle Infektionen oder durch Umweltschadstoffe ausgelöst werden kann. Es wird dabei ein deutlicher Anstieg der Neutrophilen im Sputum und in den Atemwegswänden sowie eine vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren beobachtet. Zusätzlich ist bei schwereren Formen eine Ausbildung von Lymphfollikeln zu beobachten, vermutlich als Reaktion auf eine chronische bakterielle Besiedelung und akute Exazerbationen (BARNES et al. 2003). Die starke Atemflussminderung führt zum zusätzlichen Einfangen der Luft mit Überblähung der Alveolen, erhebliche Dyspnoe und Hypoxie sind die Folgen (GOLD 2011).

2.2.4 Genetische Untersuchungen

Die COPD ist eine polygenetische Erkrankung und wird als klassisches Beispiel für Gen-Umwelt-Wechselwirkungen angesehen (GOLD 2011).

Bereits im Jahr 1837 wurde erstmalig das familiär gehäufte Auftreten von Lungenemphysemen durch Dr. James Jackson, Jr. beschrieben (KNUDSON 1985). Zwillingsstudien erbrachten den Beweis, dass eine genetische Prädisposition bei der COPD vorhanden ist (REDLINE et al. 1987). Bei Geschwistern von schwer kranken COPD-Patienten wurde ein signifikant erhöhtes familiäres Risiko für eine Atemflussminderung beobachtet (McCLOSKEY et al. 2001).

Die Alpha 1-Antitrypsin-Defizienz (AATD) stellt den bedeutendsten bisher identifizierten Gendefekt mit hohem Risiko für die Entwicklung einer COPD dar. Dieser Mangeldefekt betrifft jedoch nur etwa 1-2% der COPD-Kranken (PILLAI et al. 2009). Die vorzeitige und beschleunigte Entwicklung eines panlobulären Emphysems und die Abnahme der Lungenfunktion treten bei Rauchern und Nichtrauchern mit AATD auf (GOLD 2011).

Durch Kopplungsstudien konnten chromosomale Regionen, z.B. auf Chromosom 2 mit einer Prädisposition für die COPD identifiziert werden (SILVERMAN et al. 2002; CHA et al. 2009).

Literaturübersicht

Es wurden verschiedene Kandidatengene der COPD-Pathogenese in Assoziationsstudien untersucht, insbesondere:

- Microsomale Epoxid Hydrolase 1 (SMITH und HARRISON 1997; KIM et al. 2009; CASTALDI et al. 2009)
- Serpin Peptidase Inhibitor E2 (KIM et al. 2009; CHA et al. 2009)
- ADRB2 (KIM et al. 2009)
- TGF-beta1 (WU et al. 2004)
- TNF-alpha (HUANG et al. 1997)

Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch größtenteils noch uneinheitlich und es konnten bisher keine funktionellen Genvarianten identifiziert werden, welche die Entstehung der COPD beeinflussen (GOLD 2011).

In der ersten genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) in Bezug auf die COPD von PILLAI et al. 2009 konnte eine eindeutige Assoziation von alpha-Nicotin-Acetylcholin-Receptor 3/5 (CHRNA 3/5) auf Chromosom 15 zur COPD gezeigt werden und sie fanden eine Region auf Chromosom 4 mit Hinweisen auf einen COPD-Risikofaktor. In früheren Studien wurde bereits eine Assoziation von CHRNA 3/5 zu Lungenkrebs und Nikotinabhängigkeit beschrieben und es wird vermutet, dass diese chromosomale Region direkten Einfluss auf die Entwicklung zigarettenrauch-assoziiierter Zustände hat (PILLAI et al. 2009).

DEMEO et al. brachten 2009 durch Kombination von GWAS und Genexpressionanalysen aus Lungengewebe das Iron Regulator Protein 2 (IREB2) auf Chromosom 15 mit einer COPD-Prädisposition in Verbindung. Durch pathologische Beeinflussung des Eisenhaushalts könnte IREB2 in der Lunge zu oxidativem Stress und Autophagie führen (DEMEO et al. 2009).

2010 wurde von CHO et al. in einer weiteren GWAS eine signifikante Assoziation des Family with Sequence Similarity 13 Member A1-Gens (FAM13A-Gen) auf Chromosom 4 zur COPD gezeigt. FAM13A spielt eine vermeintliche Rolle bei der Signaltransduktion, aber bisher ist noch wenig über die Funktion dieses Gens

bekannt. In verschiedenen Zelllinien konnte unter hypoxischen Zuständen eine erhöhte Expression von FAM13A beobachtet werden (CHO et al. 2010).

Anfang 2010 wurden zwei Meta-Analysen zur gestörten Lungenfunktion bei COPD-Patienten veröffentlicht, zum einen durch das SpiroMeta Consortium (REPAPI et al. 2010) und zum anderen durch das CHARGE Consortium (HANCOCK et al. 2010). In diese GWAS konnten jeweils über 20.000 Probanden einbezogen werden, was die Power dieser Studien im Vergleich zu vorherigen deutlich erhöht. Mehrere neue Genloci mit genomweit signifikanten Assoziationen für Risikofaktoren einer COPD konnten identifiziert werden. Mitte 2011 folgten die Ergebnisse einer weiteren Meta-Analyse zur COPD, in welche fast 50.000 Europäer eingeschlossen wurden (ARTIGAS et al. 2011). Eine Übersicht über die Genloci mit genomweit signifikanter Assoziation nach dieser Meta-Analyse gibt Tabelle 2. Die assoziierten SNPs lagen teils in Genen, teils in der Nähe von Genen weshalb hier eine Assoziation zu Genloci angegeben ist.

Tab. 2: Genloci mit genomweit signifikanter Assoziation zu gestörter Lungenfunktion bei COPD-Patienten

Genlocus	Chromosom	SNP	Referenz
TNS1	2	rs2571445	SpiroMeta Consortium REPAPI et al. 2010
GSTCD	4	rs10516526	
HTR4	5	rs3995090, rs6889822	
AGER	6	rs2070600	
THSD4	15	rs12899618	
HHIP	4	rs1980057, rs1032295	CHARGE Consortium HANCOCK et al. 2010
ADAM19	5	rs1422795, rs2277027	
HTR4	5	rs11168048, rs7735184	
GPR126	6	rs11155242	
AGER-PPT2	6	rs2070600, rs10947233	
MFAP2	1	rs2284746	ARTIGAS et al. 2011
TGFB2-LYPLALI1	1	rs993925	
HDAC4-FLJ43879	2	s12477314	
RARB	3	rs1529672	
MECOM (EVI1)	3	rs1344555	
SPATA9-RHOBTB3	5	rs153916	
ARMC2	6	rs2798641	
NCR3-AIF1	6	rs2857595	
ZKSCAN3	6	rs6903823	
CDC123	10	rs7068966	
C10orf11	10	rs11001819	
LRP1	12	rs11172113	
CCDC38	12	rs1036429	
MMP15	16	rs12447804	
CFDP1	16	rs2865531	
KCNE2-LINC00310	21	rs9978142	

Die Aufklärung der Mechanismen, durch welche diese Genloci die Lungenfunktion beeinflussen dürfte zu einem vollständigeren Verständnis der Regulation der Lungenfunktion und der COPD-Pathogenese führen (ARTIGAS et al. 2011).

Die assoziierten Genloci enthalten Gene mit biologisch plausiblen Funktionen aber konnten noch nicht als genetische Risikofaktoren der COPD bewiesen werden und ihre Identifikation erfordert zukünftige Forschung. Einige der assoziierten SNPs sind möglicherweise funktionell, aber die meisten markieren Varianten mit noch unbekannter Funktion (HANCOCK et al. 2010).

2.3 ZUR EQUINEN CHRONISCH OBSTRUKTIVEN BRONCHI(OLI)TIS (COB)

2.3.1 Definition COB/RAO/Heaves

Die chronisch obstruktive Bronchitis bzw. Bronchiolitis (COB), Recurrent Airway Obstruction (RAO, „wiederkehrende Atemwegsobstruktion“) sowie Heaves („Dampf“) bezeichnen alle eine nicht infektiöse, chronisch entzündliche, reversible Atemwegseinengung des erwachsenen Pferdes (LEGUILLETTE 2003).

Als Resultat eines Arbeitstreffens der führenden Pferdepneumologen im Jahr 2000, das zum Ziel hatte den Wissensstand in Bezug auf chronische Erkrankungen der tiefen Atemwege des Pferdes zu sammeln und den Phänotyp „Heaves“ zu definieren konnten 23 Schlussfolgerungen formuliert und sechs Kriterien für die eindeutige Zuordnung zum Heaves-Erscheinungsbild aufgestellt werden (ROBINSON 2001). Demnach steht nach Punkt 3 der Schlussfolgerungen der Begriff Heaves oder RAO für eine Atemwegsobstruktion erwachsener Pferde, welche sich durch Veränderung der Umweltbedingungen oder den Einsatz von Bronchodilatoren als reversibel erweist. Eine Heaves-Exazerbation, d.h. eine dramatische Verschlimmerung der Symptomatik wird durch das Einatmen organischer Stäube ausgelöst, die Schimmelpilze, Endotoxine und andere proinflammatorische Agentien enthalten (Punkt 13). Ursache für die Einengung der tiefen Atemwege ist in erster Linie der Bronchospasmus, gerade während einer Exazerbation (Punkt 8). Zudem sind Ansammlungen von Schleim und Entzündungszellen im Atemwegslumen sowie eine entzündliche Schleimhautschwellung von Bronchioli und Bronchien verantwortlich für die Obstruktion (Punkt 9). Während einer Exazerbation dominieren neutrophile

Literaturübersicht

Granulozyten das entzündliche Geschehen im Atemwegslumen (Punkt 11). Bei Haltung der betroffenen Tiere unter staubarmen Bedingungen zeigt sich eine klinische Remission, bei der Atemwegsentzündung, -obstruktion oder Hyperreagibilität in geringem Maß bestehen bleiben können (Punkt 10).

Definitionsgemäß muss beim Heaves-Phänotyp durch Provokation mit organischen Stäuben, dem sogenannten „environmental challenge“ eine im Prinzip reversible Atemwegsobstruktion hervorgerufen werden. Diese Einengung der tiefen Atemwege muss entweder anhand einer Lungenfunktionsmessung mit einer maximalen Interpleuraldruckdifferenz ($\Delta P_{pl_{max}}$) von $> 15\text{cm H}_2\text{O}$ oder einem validierten Kliniksscore belegt werden. Zudem wird der Nachweis einer Atemwegsentzündung mittels bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) mit einem Mindestanteil von 25% neutrophiler Granulozyten gefordert.

Das Erfüllen dieser Kriterien ist am klinischen Patienten aus ethischen und praktischen Gründen in aller Regel nicht herbeizuführen. Die meisten Besitzer werden nur Maßnahmen zustimmen, die wenig invasiv und diagnostisch oder therapeutisch erfolgversprechend sind. Spirometrische Lungenfunktionsmessungen dienen beim Pferd vorwiegend wissenschaftlichen Untersuchungen und sind auf Fachkliniken beschränkt (FEY 2005).

Die Diagnose RAO bzw. Heaves erfordert per Definition den reproduzierbaren Wechsel zwischen Exazerbation und klinischer Symptombefreiheit. Da diese beiden Extremzustände in praxi nicht zu sichern sind sollte der Begriff RAO/Heaves entsprechend überprüfbar (Versuchs-)Tieren vorbehalten bleiben (FEY 2005). Aus diesem Grund wird im Folgenden der Begriff chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis zur Bezeichnung wiederkehrender, chronisch entzündlicher Atemwegsobstruktionen gewählt.

Die Routinediagnostik bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen umfasst an Tierkliniken gewöhnlich eine ausführliche Anamnese, eine eingehende spezielle klinische Untersuchung des Respirationsapparates in Ruhe und nach Belastung, eine arterielle Blutgasanalyse in Ruhe mit Berechnung der Alveolo-arteriellen Sauerstoffpartialdruckdifferenz, eine Tracheoendoskopie mit Entnahme von Tracheobronchialsekret (TBS) und/oder BALF mit anschließender zytologischer Untersuchung und eventuell das Anfertigen von Röntgenaufnahmen des Thorax.

Bei der COB handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose. Entscheidende Hinweise auf das Vorliegen einer COB liefert bereits der Vorbericht, typisch ist ein Zusammenhang der Atemwegssymptomatik mit einer Staubexposition. Gefordert wird der Nachweis einer Chronizität der Erkrankung von mindestens sechs Wochen. Besteht der Verdacht, dass sich initial ein Infekt ereignet hat sollte die Diagnose einer COB erst gestellt werden, wenn die Symptomatik seit drei Monaten besteht. Weichen einzelne Befunde untypisch von zu erwartenden Veränderungen bei der COB ab kann nur eine Verdachtsdiagnose ausgesprochen werden. Auszuschließen sind insbesondere akute oder chronisch persistierende Infektionen, die weiterführende Diagnostik erfordern, einschließlich einer BALF-Zytologie, welche die Art und Schwere der Entzündung der tiefen Atemwege näher beurteilen kann (FEY 2006).

2.3.2 Inflammatory Airway Disease (IAD)

Als weitere chronische, nicht infektiös bedingte Lungenerkrankung beim Pferd ist die Inflammatory Airway Disease beschrieben. Betroffene Pferde zeigen Leistungsmangel, gelegentlich Husten und eventuell mukösen Nasenausfluss. Der entscheidende Unterschied zur COB liegt laut einem Konsensuspapier des American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) darin, dass in Ruhe keine Atemwegsobstruktion erkennbar ist (COUETIL et al. 2007). Die Abgrenzung zur asymptomatischen bzw. geringgradigen COB ist in vielen Fällen schwierig bis unmöglich (ROBINSON 2001). Die IAD ist vorwiegend bei jüngeren Hochleistungspferden wie Vollblütern und Trabern dokumentiert und über den erhöhten Entzündungszellnachweis in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) mittels zytologischer Untersuchung definiert (COUETIL et al. 2007).

2.3.3 Klinisches Bild, auslösende Faktoren und Prävalenz der COB

Die chronisch obstruktive Bronchitis bzw. Bronchiolitis stellt in unseren Breiten die häufigste nichtinfektiöse Erkrankung des Respirationstraktes von erwachsenen Pferden in Stallhaltung mit Heufütterung dar (MAIR und DERKSEN 2000). Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch Husten, eine verstärkt abdominal betonte Ausatmung, teils bereits in Ruhe, Leistungsminderung und eventuell mukösen

Nasenausfluss für mehr als sechs Wochen. Die Ausprägung des Krankheitsbildes kann zwischen kaum feststellbar, mit einer geringgradig vermehrt betonten Expiration als einzigem Symptom bis hin zur hochgradigen gemischten Ruhedyspnoe mit weitgestellten Nüstern variieren (FEY 2006).

Auslösende Faktoren sind in erster Linie organische Staubpartikel in Heu und Einstreu, die Schimmelpilzsporen und bakterielle Endotoxine enthalten können. Ihre Inhalation führt in empfänglichen Individuen zu einer Hyperreagibilität der tiefen Atemwege mit Bronchospasmus, Schleimhautschwellung und Dyskrinie sowie Hyperkrinie (FEY 2006). Die Krankheit kann in diesem Stadium auch durch andere unspezifische Gase (z.B. Ammoniak) und Stäube (z.B. in der Reithalle) aufrecht erhalten werden. Alleine durch Staub- und Schadgasvermeidung in der Umgebung des Patienten wird die Symptomatik und Einsatzfähigkeit oft erheblich verbessert. Andererseits erleidet ein typischer COB-Patient bei plötzlicher hochgradiger Staubexposition eine akute, lebensbedrohliche Verschlechterung der Grunderkrankung, eine Exazerbation (ROBINSON 2001). Durch die verbesserte Information von Pferdebesitzern und -haltern und der daraus resultierenden Optimierung von Haltungs- und Managementbedingungen werden heutzutage vor allem Pferde mit einer eher milden, chronisch verlaufenden Erkrankungsform vorgestellt (FEY 2005).

Auffällig ist, dass unter gleichen Haltungsbedingungen jedoch nur bestimmte, offensichtlich anfällige Individuen an der COB erkranken. Zahlreiche Nachweise einer familiären Häufung der wiederkehrenden Atemwegsobstruktion lassen auf eine genetische Prädisposition schließen (GERBER et al. 2008).

Weiterhin werden als auslösende Faktoren auch initiale Virusinfektionen des Respirationstraktes diskutiert, die bei mangelhafter Regeneration des Epithels von Bronchioli und Bronchien zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft der Atemwege auf inhalierte Partikel und Gase führen. Laut einer retrospektiven Studie hatten 19,2% aller COB-Patienten vorberichtlich eine Atemwegsinfektion durchgemacht (DIXON et al. 1995). Nach anderen Untersuchungen von McPHERSON et al. (1978) litten 65,8% der COB-Patienten vorberichtlich schon einmal an einer fiebrigen Infektion der Atemwege.

Literaturübersicht

Die Angaben zur Prävalenz der COB weichen je nach Einschlusskriterien (LEGUILLETTE 2003) und klimatischen Einflüssen stark voneinander ab (McPHERSON et al. 1978; LARSON und BUSCH 1985; WINDER und VON FELLEBERG 1987; BRACHER et al. 1991; MORRIS und SEEHERMAN 1991; ROBINSON et al. 1996; LEGUILLETTE 2003). WINDER und VON FELLEBERG fanden 1987 bei 37,4% der Schlachtpferde in der Schweiz histologische Anzeichen einer chronischen Bronchitis. Nach Untersuchungen von BRACHER et al. (1991) litten 54% der untersuchten Schweizer Pferde in unterschiedlichen Schweregraden an der Erkrankung. Eine andere Untersuchung fand 2002 bei 54% der Pferde einer randomisierten Population in der Schweiz Anzeichen einer subklinischen bis mittelgradigen COB (FEIGE et al. 2002). HOTCHKISS et al. erfassten 2007 mit Hilfe eines standardisierten Risiko-Fragebogens in Bezug auf die Lungengesundheit eine COB-Prävalenz von 14% in der Pferdepopulation in Großbritannien (HOTCHKISS et al. 2007).

Betroffen sind überwiegend Pferde die älter als sieben Jahre alt sind (COUETIL und WARD 2003; AINSWORTH 2010) und es ist eine deutliche Zunahme der Krankheitsanzeichen mit steigendem Alter zu erkennen (LEGUILLETTE 2003; COUETIL und WARD 2003; HOTCHKISS et al. 2007). In einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie zur Analyse von Risikofaktoren für die COB in der nordamerikanischen Pferdepopulation von COUETIL und WARD (2003) zeigten Vollblüter ein erhöhtes Risiko an einer COB zu erkranken und Stuten ein 1,4-fach höheres Risiko im Vergleich zu männlichen Tieren. In trockenen Regionen der Erde, wie in Kalifornien oder Australien spielt die equine COB keine nennenswerte Rolle (ROBINSON et al. 1996).

2.3.4 Pathomechanismen der COB und immunologische Hintergründe

Bei der equinen COB spielen obstruktive Atemwegsveränderungen eine entscheidende Rolle. Diese Verengung der Bronchien und Bronchioli wird einerseits durch Bronchospasmen, andererseits durch die Ansammlung von übermäßig viskösem Sekret in den tiefen Atemwegen verursacht (ROBINSON et al. 1996). Eine entzündliche Schleimhautschwellung mit Ödematisierung und Hyperplasie des Epithels führt zudem zur Obstruktion der kleinen Atemwege (DERKSEN 1993). Nach

Literaturübersicht

DEEGEN kommen zum einen die Hyperreagibilität der Atemwege und zum anderen die Störung der mukoziliären Clearance als zentrale Auslöser für die Bronchialobstruktion in Betracht (DEEGEN 1992).

Unter Hyperreagibilität versteht man die übermäßige Bereitschaft der Atemwege auf inhalierte Noxen mit einer starken Verengung des Bronchialdurchmessers zu reagieren (DERKSEN und ROBINSON 2002). Die Erregung von sensorischen Rezeptoren in der Schleimhaut durch Inhalation von Staub und Schadgasen oder durch Entzündungsmediatoren führt zu einer Aktivierung des Parasympathikus mit folgender Acetylcholinfreisetzung. Dies verursacht einen Bronchospasmus und eine gesteigerte Mukussekretion (DERKSEN und ROBINSON 2002). Bei der COB wird die cholinerg vermittelte Verkrampfung der Bronchialmuskulatur durch Entzündungsmediatoren gefördert (OLSZEWSKI et al. 1999). Durch den andauernden Bronchospasmus kommt es zur Hypertrophie der Bronchialmuskulatur und Verschlimmerung der Konstriktion. Die chronische Entzündung der tiefen Atemwege legt sogenannte „irritant receptors“ frei und macht sie angreifbar (DEEGEN et al. 1987). In diesem Stadium reichen bereits kleinste Partikelmengen in der eingeatmeten Luft um eine übermäßige Abwehrreaktion auszulösen (DERKSEN und ROBINSON 2002).

Die mukoziliäre Clearance ist Teil der angeborenen Abwehrmechanismen der Lunge. Bei der COB kommt es entzündungsbedingt zu einem Umbau des Bronchialepithels mit Vermehrung und Größenzunahme der Becherzellen bis in die Bronchiolen hinein sowie zur Abnahme der Clara-Zellen. Zusätzlich sorgt die Aktivierung eines parasympathischen Reflexes durch inhalierte Noxen oder Entzündungsmediatoren für eine vermehrte Schleimbildung. Die erhöhte Viskosität des produzierten Schleims führt zusammen mit dem Verlust von Zilien zur Störung der mukoziliären Reinigungsfähigkeit der Atemwege und zur Ansammlung des Sekrets (DERKSEN und ROBINSON 2002).

Bei der COB dominieren neutrophile Granulozyten das zytologische Bild in TBS und BALF und ihr prozentualer Anteil korreliert mit dem Schweregrad der Atemwegsentzündung (FRANCHINI et al. 1998). Eine Provokation mittels Staubinhalation führt bei betroffenen Tieren zum raschen Einwandern neutrophiler Granulozyten in die Atemwege, welche bereits nach fünf Stunden in der BALF mit

Werten bis über 90% nachweisbar sind (McGORUM et al. 1993). Jedoch ist auch bei lungengesunden Kontrollpferden in staubhaltiger Umgebung eine gewisse Menge an Tracheobronchialsekret mit Neutrophilie zu beobachten und wird als unspezifische Abwehrreaktion auf inhalierte Partikel mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten auf chemotaktische Reize angesehen (TREMBLAY et al. 1993; ROBINSON et al. 1996; GERBER et al. 2003). Es wird vermutet, dass bei Pferden mit COB eine spezifische Immunantwort mit Zytokinfreisetzung aus Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten für die übermäßige Neutrophilie im Atemwegslumen verantwortlich ist (ROBINSON et al. 1996).

Der Nachweis erhöhter mRNA-Expressionen für IL-4 und IL-5 und einer verminderten mRNA-Expression für Interferon gamma (IFN-gamma) in CD4 positiven Lymphozyten aus BALF von COB-Pferden in Exazerbation spricht für eine T-Helfer-Zell-Reaktion vom Typ 2 mit ähnlicher Pathogenese wie beim allergischen Asthma des Menschen (LAVOIE et al. 2001).

Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen, in denen COB-Pferde in Exazerbation keine Unterschiede in der Zytokinexpression im Vergleich zu Kontrollpferden zeigten. Diese Arbeitsgruppe stellte hingegen eine erhöhte mRNA-Expression von INF gamma und IL-8 bei empfänglichen Individuen während einer chronischen Phase mit fünfwöchiger Heufütterung fest (AINSWORTH et al. 2003).

Andere Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass IL-17 durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Atemwegslumen entscheidend an der Pathogenese der COB beteiligt sein könnte (DEBRUE et al. 2005).

Die genauen immunologischen Mechanismen, die zur Neutrophilie in den tiefen Atemwegen, zur übermäßigen Schleimproduktion und zur Bronchokonstriktion führen sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Nach einer Übersicht von (AINSWORTH 2010) stimmen die meisten Forscher darin überein, dass zahlreiche verschiedene Zelltypen einschließlich luminaler Entzündungszellen, Epithelzellen und glatter Bronchialmuskelzellen aktiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten in die Krankheitsprozesse einbezogen sind.

Ein komplexes Zusammenspiel von angeborenen und erworbenen spezifischen Abwehrvorgängen auf bestimmte auslösende Umweltfaktoren scheint in genetisch

prädisponierten Individuen zum Auftreten einer COB zu führen (LAVOIE 2009). Weitere Studien sind erforderlich um die für die chronische Atemwegsentzündung verantwortlichen Pathomechanismen aufzuklären. Ein möglicher Ansatz wären genetische Untersuchungen wie ein Gesamtgenomscan (s. Kap. 2.4.5, S. 34-36). Dieser bietet z.B. die Möglichkeit, ohne a priori Hypothese mit der RAO assoziierte genetische Marker zu identifizieren um anschließend die für eine Krankheitsprädisposition verantwortlichen Gene zu finden (GERBER et al. 2008).

2.3.5 Vergleich der equinen COB mit dem humanen Asthma und der COPD

Allen drei Krankheitsbildern gemeinsam ist, dass es sich um komplexe Erkrankungen handelt, die durch eine chronische Entzündung und Obstruktion der tiefen Atemwege mit Behinderung des Luftstroms gekennzeichnet sind.

2.3.5.1 Gemeinsamkeiten der equinen COB mit dem humanen Asthma

Sowohl das Asthma bronchiale als auch die equine COB zeigen charakteristischerweise eine chronische Atemwegsentzündung mit Atemwegshyperreagibilität. Im Gegensatz zum allergischen humanen Asthma mit eosinophiler Entzündung und IgE-Produktion spielen bei der COB neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle, während eine IgE-vermittelte Sofortreaktion nicht nachweisbar ist (WAGNER 2009).

Allein durch Vermeidung der auslösenden Noxe zeigt sich bei beiden Krankheitsbildern bereits eine klinische Besserung, die in ihrem Ausmaß jedoch variabel ist. Beide lassen sich durch die Gabe von Kortikosteroiden und Bronchodilatoren wie z.B. Beta-Sympathomimetika beeinflussen und weisen eine Reversibilität der klinischen Symptomatik auf (ROBINSON et al. 1996). Beim humanen Asthma erweist sich oft die (volle) Lungenfunktion als reversibel, entweder spontan oder unter Therapie, aber abhängig vom Schweregrad der Erkrankung (WARNER und KNIGHT 2008). Schwere Formen des Asthma bronchiale führen zu einer irreversiblen Schädigung an Basalmembran und Atemwegsepithel, dem sogenannten Remodeling (VIGNOLA et al. 2003). Untersuchungen von MISKOVIC et

al. (2007) zeigten bei COB-empfindlichen Pferden, die über Jahre in staubarmer Umgebung im Freien ohne Heufütterung gehalten wurden, dass diese trotz des Fehlens klinischer Anzeichen einer peripheren Obstruktion weiterhin einen reduzierten Forced Expiratory Flow (FEF) aufwiesen. Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass es ähnlich wie beim humanen Asthma auch bei der COB zu einem Remodeling der tiefen Atemwege kommt (HERSZBERG et al. 2006; MISKOVIC et al. 2007).

2.3.5.2 Gemeinsamkeiten der equinen COB mit der humanen COPD

Eine Atemwegsobstruktion stellt bei der humanen COPD wie auch bei der equinen COB einen der wichtigsten Pathomechanismen dar. Im Gegensatz zur equinen COB verläuft die Verengung bei der COPD selbst bei dauerhaftem Entzug der schädlichen Noxe progressiv (GOLD 2011). Eine Gemeinsamkeit liegt in der übermäßigen Schleimproduktion durch Metaplasie des Epithels und Zunahme der Becherzellen in den tiefen Atemwegen sowie dem Verlust von Clara-Zellen (TRAUB 2005). Bei beiden Erkrankungen dominieren neutrophile Granulozyten das Entzündungsgeschehen. Sowohl bei der equinen COB als auch bei der humanen COPD führt eine chronische Entzündung zu einem irreversiblen Umbau des Lungengewebes mit daraus resultierenden erheblichen Funktionsstörungen (DEEGEN 2005; VOGELMEIER et al. 2006).

2.3.6 Genetische Untersuchungen

Erste Beschreibungen einer familiären Häufung der COB bei Warmblutpferden gehen nach Wissen der Autorin auf SCHÄPER im Jahr 1939 zurück. In seinen Untersuchungen über die Erbllichkeit und das Wesen des Lungendampfes beim Pferd stellte er einleitend fest: *“Zu den sogenannten Erbfehlern beim Pferd zählt schon seit alters her die Dämpfigkeit (Dampf)“*. Durch familienpathologische Untersuchungen mittels Verfolgung der Nachkommenschaft dämpfiger Elterntiere über bis zu vier Generationen konnte er zeigen, dass deren Nachkommen deutlich vermehrt am Lungendampf erkrankten. SCHÄPER kam zu dem Schluss *„dass erblich bedingte Einflüsse beim Zustandekommen der Lungendämpfigkeit die*

ausschlaggebende Rolle spielen“. Er ging von einer allergischen Erkrankung, ähnlich dem Asthma bronchiale des Menschen und einem dominantem Erbgang aus. Als auslösende Faktoren postulierte er Heu und Heustaub bzw. Schimmelpilze (SCHÄPER 1939).

1957 publizierte KOCH in der Deutschen Tierärztlichen Wochenschrift seine Beobachtungen zum gehäuftem Auftreten von Lungendämpfigkeit innerhalb einer Pferdefamilie (KOCH 1957). GERBER beschrieb 1989 wie eine chronisch lungenkranke Stute mit zwei lungengesunden Hengsten fünf COB-kranke Nachkommen zeugte (GERBER 1989). In diesen Familienstudien fehlte bis dahin jedoch das Einbeziehen einer Kontrollgruppe.

MARTI et al. untersuchten 1991 anhand der Nachkommenschaft (n=153) dreier lungengesunder und dreier chronisch lungenkranker Schweizer Warmbluthengste den genetischen Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Bronchitis. Von 74 Nachkommen der gesunden Hengste erkrankten neun Pferde an einer chronischen Bronchitis wohingegen von 79 Nachkommen der lungenkranken Hengste 31 die Erkrankung ausprägten. Es konnte ein signifikanter Effekt von Hengst, Alter und Haltungs-/Umweltbedingungen auf die Entwicklung des Leidens gezeigt werden. Die Diagnose chronische Bronchitis wurde bei Pferden gestellt, die chronischen Husten mit oder ohne Dyspnoe in Stallhaltung bei Heufütterung zeigten und ein Verschwinden der respiratorischen Symptomatik durch Entzug von Heu und Stroh aufwiesen. Zudem wurden auf zwei Gestüten Pferde, die jeweils unter gleichen Haltungsbedingungen lebten, auf die Ausprägung einer chronischen Bronchitis untersucht. Es lagen dabei Angaben zur Lungengesundheit beider Elterntiere der einbezogenen 90 Warmblutpferde und 42 Lipizzaner vor. Das relative Risiko (RR) der Nachkommen an einer chronischen Bronchitis zu erkranken lag signifikant erhöht bei $RR=3,2$ wenn ein Elterntier betroffen war und stieg weiter auf $RR=4,6$ bei zwei lungenkranken Eltern (MARTI et al. 1991).

Die Studie von RAMSEYER et al. aus dem Jahr 2007 hatte das Ziel den genetischen Effekt des Hengstes, den Einfluss von Umweltfaktoren wie Haltung, Fütterung, Aufstallung und Auslauf an der frischen Luft sowie den Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Ausprägung einer milden, mäßigen oder schweren respiratorischen Symptomatik auszuwerten. Es wurden die direkten Nachkommen

(n= 307) von zwei COB-kranken Schweizer Warmbluthengsten untersucht und mit mütterlichen Halbgeschwistern (n=66) sowie einer Kontrollgruppe (n=33) nicht verwandter Warmblutpferde gemischten Alters verglichen. Ein standardisierter Fragebogen wurde entworfen um den Phänotyp in Bezug auf die Lungengesundheit der Pferde sowie deren Umwelt- und Haltungsbedingungen zu erfassen. Basierend auf den Angaben der Besitzer zu klinischen Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung wurden die Pferde anhand eines Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index (HOARSI) in vier Kategorien eingeteilt. HOARSI 1 bezeichnet Pferde die keinerlei Anzeichen einer chronischen Atemwegsproblematik aufweisen. HOARSI 2 entspricht Pferden mit milden respiratorischen Symptomen wie gelegentlichen Husten und/oder Nasenausfluss. HOARSI 3 steht für mittelgradige Anzeichen eines chronisch respiratorischen Leidens mit erschwerter Atmung und/oder regelmäßigem bis ständigem Husten. HOARSI 4 beschreibt eine schwere, chronische Atemwegserkrankung mit erschwerter Atmung, ständigem Husten verbunden mit Leistungsminderung. Alle Studienpferde mussten Zugang zu Heu haben oder gehabt haben. Es wurde eine Chronizität der Erkrankung von mindestens zwei Monaten gefordert sowie eine Verbesserung der Symptomatik bei Entfernen von trockenem Heu. Die Kategorisierung der chronisch lungenkranken Pferde erfolgte zum Zeitpunkt der schlimmsten respiratorischen Symptome. Die Nachkommen der beiden COB-betroffenen Hengste litten im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich häufiger an einer mittel- bis hochgradigen respiratorischen Problematik. Das relative Risiko dieser Tiere an einer COB zu erkranken war um das 4,1-fache (Nachkommen von Hengst 1) bis 5,5-fache (Nachkommen von Hengst 2) erhöht. Mittels Regressionsanalyse der per Fragebogen erhobenen Daten konnte eine Assoziation von Zuchthengst, Heufütterung und Alter mit der Ausprägung mäßiger bis schwerer Symptome einer chronischen Atemwegserkrankung gezeigt werden (RAMSEYER et al. 2007).

Auf Grundlage der vorherigen Ergebnisse führten JOST et al. 2007 eine Kandidatengenanalyse mit den beiden Familien durch. Das Interleukin-4-Rezeptor-alpha-Gen (IL-4R alpha) wurde als Kandidat gewählt, da dieses Gen mit dem humanen Asthma und atopischen Phänotypen beim Menschen assoziiert ist. Zudem steuert sein Genprodukt zusammen mit IL-4 und IL-13 die Produktion von IgE in B-Zellen und die Differenzierung von naiven T-Zellen zu allergiefördernden TH2-Zellen

(GERBER et al. 2008). Mittels Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) wurde das IL-4R alpha-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 13 lokalisiert. Vier Mikrosatellitenmarker aus dieser bestimmten chromosomalen Region wurden eingesetzt um die Nachkommen der beiden Schweizer Hengste auf Assoziation zu HOARSI, Husten und Nasenausfluss zu untersuchen. Bei den Nachkommen von Hengst 1 konnten Assoziation und Kopplung der untersuchten Mikrosatelliten mit der Ausprägung klinischer Anzeichen einer COB nachgewiesen werden, jedoch nicht bei denen von Hengst 2. Diese Ergebnisse lassen auf eine Lokus-Heterogenität bei der Vererbung der Erkrankungsneigung schließen (JOST et al. 2007).

Segregationsanalysen der HOARSI-Daten der direkten Nachkommen dieser beiden COB-kranken Hengste aus der Schweiz (n=360) wiesen eine sehr hohe Heritabilität ($h^2=1$) auf. Die Gegenüberstellung von mehreren genetischen Modellen und einem Umweltmodell deuten auf einen gemischten Erbgang unter der Beteiligung von Hauptgenen. In der Familie von Hengst 1 zeigte sich eine autosomal rezessive Vererbung des vermuteten Hauptgens, in der zweiten Hengstfamilie war der Erbgang autosomal dominant. Dies lässt auf unterschiedliche Hauptgene in den beiden Familien und einen komplexen genetischen Hintergrund der COB schließen (GERBER et al. 2009).

Unter dieser Annahme untersuchten SWINBURNE et al. (2009) in einem genomweiten Ansatz mit 250 gleichmäßig verteilten Mikrosatellitenmarkern einen Teil derselben Halbgeschwister (n=239), um Chromosomenregionen zu identifizieren, in denen genetische Varianten mit Prädisposition für eine COB lokalisiert sind. Durch Regressionsanalysen konnten Quantitative Trait Loci (QTLs), d.h. Genloci mit Einfluss auf die Ausprägung quantitativ fassbarer Merkmale, ermittelt werden. Die Identifizierung von QTLs ist in der Medizin zum Auffinden von krankheitsrelevanten Genen von Bedeutung (PASSARGE 2008b). In QTL-Studien wird die Ausprägung eines bestimmten Merkmals in Relation zu Variationen von genetischen Markern untersucht (NICHOLAS 2010b). In der Studie von SWINBURNE et al. fanden sich QTLs mit chromosomenweiter Signifikanz auf elf Chromosomen und mit genomweit signifikanten Signalen auf Chromosom 13 für Familie 1 und auf Chromosom 15 für Familie 2. Kopplungsanalysen fanden ebenfalls Signale für HOARSI auf Chromosom 13 (Hengstfamilie 1) und Chromosom 15 (Hengstfamilie 2) sowie Hinweise auf ein QTL auf Chromosom 21 (Hengstfamilie 1). In diesen chromosomalen Regionen mit

der höchsten Signifikanz für QTLs bezogen auf eine COB-Prädisposition liegen zahlreiche Kandidatengene. Zu diesen Kandidaten gehören Interleukin 27 (IL-27) (CHAE et al. 2007), Interleukinrezeptoren wie IL-4R (HYTONEN et al. 2004), IL-7R (SHAMIM et al. 2007), IL-21R (HECKER et al. 2003) und der Prostaglandin E-Rezeptor 4 (PTGER4) (KIM et al. 2007), welche eine Assoziation zum humanen Asthma aufweisen. Ein weiteres Kandidatengenen stellt Phosphodiesterase 4D (PDE4D) (HOMMA et al. 2006) dar, welches mit der humanen COPD assoziiert ist. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls wie bei JOST et al. (2007) für eine genetische Heterogenität bei der Vererbung der COB. Es ist wahrscheinlich, dass zahlreiche Genloci an der Ausprägung einer COB beteiligt sind (SWINBURNE et al. 2009).

NUSSBAUMER untersuchte 2009 in derselben Warmblutpopulation einen möglichen Zusammenhang zwischen der genetischen Prädisposition für eine COB und der Resistenz gegen intestinale Parasiten. In voraus gegangenen Untersuchungen von NEUHAUS et al. wurde beobachtet, dass chronisch lungenkranke Nachkommen von Hengst 1 deutlich weniger Strongylideneier ausscheiden als unter gleichen Bedingungen gehaltene lungengesunde Kontrolltiere. Kotproben der Nachkommen beider Hengste wurden mittels eines kombinierten Sedimentations-Flotations-Verfahrens sowie eines modifizierten McMaster-Verfahrens ausgewertet und die Eiausscheidung als binäres Merkmal (positiv/negativ) dargestellt. Der Einfluss von Hengst, Geschlecht, HOARSI, Alter, Abmisten der Weiden, geographische Lage und Höhe, Gemischtbewirtschaftung und Mähen der Weiden auf die Eiausscheidung wurde statistisch erfasst. Alle 177 einbezogenen Pferde wurden zudem durch einen Genomscan mit Mikrosatellitenmarkern genotypisiert (SWINBURNE et al. 2009). Auf Grundlage dieser Daten wurde die Kopplung von Eiausscheidung mit den eingesetzten Mikrosatelliten berechnet. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass mehrere Hauptgene die Vererbung in Bezug auf die Eiausscheidung beeinflussen. Die Ausscheidung von Strongylideneiern war in Familie 1 signifikant vermindert und mit der Prädisposition für eine COB assoziiert, was in Familie 2 nicht der Fall war. Es konnten signifikante QTLs für die Eiausscheidung auf Chromosom 15 für Familie 1 und auf Chromosom 20 für Familie 2 nachgewiesen werden. Verschiedene Kandidatengene wie das IL-1R-Gen (TITUS et al. 1991) und das IL-18R-Hilfsprotein-Gen (SASAKI et al. 2005) auf Chromosom 15 und Gene aus dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) auf

Chromosom 20 spielen eine Rolle in der Pathogenese von allergischen Erkrankungen und in der Parasitenabwehr (NUSSBAUMER 2009).

2.3.7 Fragebogen zur Untersuchung der equinen COB

2006 wurde von HOTCHKISS ein Fragebogen (Risk Screening Questionnaire, RSQ) zur epidemiologischen Untersuchung der COB in der Pferdepopulation in Großbritannien entworfen. Dieser ist dem HOARSI-Fragebogen (RAMSEYER et al. 2007) sehr ähnlich, jedoch noch detaillierter in Bezug auf Haltung, Fütterung, Management und Infektionen des Respirationstraktes im zweiten bis fünften Lebensjahr. Der RSQ musste von den Pferdebesitzern selbst ausgefüllt werden, die hierfür randomisiert ausgewählt wurden. Die Validierung des Fragebogens erfolgte anhand einer tierärztlichen Diagnose einschließlich respiratorischer Zytologie an 40 Fällen und 40 Kontrollen als Referenzstandard. Die Ergebnisse ließen auf eine Sensitivität des RSQ von 83% und eine Spezifität von 85% in Bezug auf die Diagnose COB schließen (HOTCHKISS et al. 2006).

2010 wurde von LAUMEN et al. überprüft wie gut die HOARSI-Einteilung von RAMSEYER et al. (s. Kap. 2.3.6, S. 25-26), die bis zu dem Zeitpunkt ausschließlich auf Besitzerangaben basierte, mit den Befunden einer ausführlichen Untersuchung des Respirationstraktes übereinstimmt. Das Ziel der Untersuchung war zu ermitteln ob HOARSI 3 und 4 die bei einer COB zu erwartenden, charakteristischen Veränderungen aufweisen. Zudem sollten mögliche phänotypische Unterschiede in der Ausprägung einer chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung zwischen den beiden Hengstfamilien abgeklärt werden, da vorherige Untersuchungen für eine genetische Heterogenität sprechen (JOST et al. 2007; GERBER et al. 2009; SWINBURNE et al. 2009). Dazu wurden 71 direkte Nachkommen der beiden Schweizer COB-kranken Hengste mittels Fragebogen in HOARSI 1-4 kategorisiert. Alle 71 Pferde wurden eingehend klinisch und durch spezielle weiterführende Diagnostik untersucht. Es wurden eine klinische Untersuchung des Atmungsapparates in Ruhe inklusive CO₂-Rückatmung, eine arterielle Blutgasanalyse, eine Tracheobronchoskopie mit Bewertung der Schleimansammlung, zytologische Untersuchungen von TBS und BALF und eine klinische Beurteilung (anhand von Atemfrequenz, Atemtyp und Husten) der

Reaktivität der tiefen Atemwege auf eine Inhalation von Methacholin durchgeführt. Pferde, die zum Zeitpunkt der Untersuchung Husten, erschwerte Atmung und Leistungsmangel zeigten wurden als HOARSI 3/4 in klinischer Exazerbation eingestuft (n=12). Pferde die aufgrund ihres Vorberichts mit HOARSI 3 oder 4 bewertet wurden und die bei der Untersuchung klinisch keine Hinweise auf eine obstruktive Atemwegserkrankung erkennen ließen, wurden als HOARSI 3/4 in klinischer Remission kategorisiert. Die Ergebnisse belegen, dass HOARSI 3/4 in Exazerbation mit dem RAO-Phänotyp nach den Konsensus-Kriterien (ROBINSON 2001) übereinstimmen. Es konnte kein Unterschied bezüglich des klinischen Phänotyps zwischen beiden Familien festgestellt werden. Die exakte Phänotypisierung ist von höchster Bedeutung in der Bewertung genetischer Studien. HOARSI ermöglicht die zuverlässige Identifikation von COB-betroffenen Pferden und das Erfassen der gesuchten Phänotypen in großem Umfang (LAUMEN et al. 2010).

2.4 GRUNDLAGEN ZUR GENETISCHEN ANALYTIK

Das Genom des Pferdes zählt zu den am besten untersuchten unter den Haussäugetieren. 2007 gelang die vollständige Sequenzierung (EWART und ROBINSON 2007) der 2,68 Milliarden Basenpaare des Pferdegenoms (CHOWDHARY und RAUDSEPP 2008). Für alle 31 Autosomen des Pferdes als auch für die Geschlechtschromosomen gibt es Genkarten, die die exakte Lage der Gene im Genom angeben. Im Rahmen der Sequenzierung sind rund 1,5 Millionen Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) mit bekannter Lokalisation im Genom für unterschiedliche Pferderassen kartiert worden (CHOWDHARY und RAUDSEPP 2008).

Die Entwicklung von SNP-Chips für das Pferd bietet die Möglichkeit durch sogenannte Gesamtgenomscans anhand von Markerassoziationen Genloci mit Prädisposition für Erkrankungen zu identifizieren (Illumina®, San Diego, USA; s. Kap. 2.4.5, S. 34-36). Eine möglichst dichte Verteilung von validierten SNPs ist die Voraussetzung für das Erkennen von Genomabschnitten, die Kandidatengene mit Prädisposition für eine Krankheit oder andere Merkmale tragen, die die Gesundheit und das Wohl der Pferde beeinträchtigen (CHOWDHARY und RAUDSEPP 2008).

Im Vergleich zum Pferd wird beim Menschen die Forschung zur genetischen Analytik seit 2002 durch eine internationale Vereinigung, das International HapMap Project, noch in viel stärkerem Maß vorangetrieben. Für das menschliche Genom wurde im Oktober 2010 die Kartierung von annähernd 15 Millionen SNPs veröffentlicht. In den letzten fünf Jahren war eine massive Zunahme von humanen genomweiten Assoziationsstudien zu verzeichnen (<http://www.genme.gov/gwastudies/>) und es konnten bisher über 1000 Regionen mit Assoziation zu Erkrankungsneigungen und anderen Merkmalen identifiziert werden (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM 2010). Für humane Studien sind bereits SNP-Chips mit 4,3 Millionen SNPs verfügbar (Illumina®, San Diego, USA).

2.4.1 Genotyp und Phänotyp

Der Genotyp repräsentiert die Gesamtheit aller Erbanlagen eines Lebewesens (PSCHYREMBEL 1998). Diese genetische Information bestimmt den morphologischen und physiologischen Phänotyp (PASSARGE 2008b). Der Phänotyp ist das Erscheinungsbild eines Lebewesens. Man versteht darunter die Summe aller beobachtbaren Merkmale, die sich aus der Interaktion von Genotyp und Umwelteinflüssen ergibt (HOFFMANN 2006). Beim Phänotyp handelt es sich um messbare Charakteristika (DEPNER 2009), wie z.B. die Ausprägung einer equinen COB oder ihrer Symptome bei entsprechender Staubexposition.

2.4.2 Genetische Marker

Als genetische Marker bezeichnet man eindeutig identifizierbare, variable DNA-Abschnitte. Ihre DNA-Sequenz muss hinreichend variabel sein, um Unterschiede zwischen Individuen zu identifizieren, andererseits muss sie auch hinreichend spezifisch sein um einen Genort lokalisieren zu können (DEPNER 2009).

Es ist bekannt, dass Genloci (Genlocus: Position eines Gens auf einem Chromosom), die auf demselben Chromosom nahe bei einander liegen gemeinsam d.h. gekoppelt vererbt werden (PASSARGE 2008b). Diese Tatsache wird in Kopplungsanalysen und Gesamtgenomscans genutzt. Dabei werden möglichst viele

polymorphe Markerloci im Hinblick auf Kopplung mit einem gesuchten Krankheitslocus geprüft (PASSARGE 2008a).

2.4.3 DNA-Polymorphismus

Als DNA-Polymorphismus bezeichnet man in der Genetik das Auftreten einer oder mehrerer Genvarianten an einem Genlocus innerhalb einer Population (NICHOLAS 2010c). Definitionsgemäß muss die Häufigkeit der Genvariante größer als ein Prozent sein, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen (DEPNER 2009). Genvarianten ergeben sich durch individuelle Unterschiede in der Abfolge der DNA-Nukleotide, deren Analyse daher als genetische Marker zur Charakterisierung von Individuen, Populationen und chromosomalen Regionen genutzt wird (GELDERMANN 2005). Nukleotide sind DNA-Untereinheiten. Ein Nukleotid setzt sich aus einer der vier Nukleotidbasen Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin sowie einem Zucker (Desoxyribose) und einer Phosphatgruppe zusammen. Über Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basenpaaren Cytosin und Guanin sowie Adenin und Thymin bildet sich der DNA-Doppelstrang aus. Die Nukleotidkette entsteht über Phosphatverbindungen zwischen den Zuckern, welche den invariablen Teil der DNA bilden. Dagegen ist die Sequenz der Nukleotidbasen variabel. (PASSARGE 2008b).

Die häufigsten Sequenzvariationen sind die Einzelnukleotid-Polymorphismen, so genannte Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs, s.u.). Auf andere DNA-Polymorphismen wie z.B. Mikrosatelliten (auch Short Tandem Repeats, STRs) und Minisatelliten (auch Variable Number Tandem Repeats, VNTRs), aus kurzen oder längeren tandemartig wiederholten DNA-Sequenzen (PASSARGE 2008b) wird nicht weiter eingegangen, da diese in der vorliegenden Arbeit keine Rolle spielen.

2.4.4 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

DNA-Varianten, die auf einzelne Nukleotidpositionen zurückzuführen sind, werden Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) oder Einzelnukleotid-Polymorphismen genannt (GELDERMANN 2005). Sie stellen zufällig über das Genom verteilte

Unterschiede einzelner Basenpaare dar, die von Generation zu Generation vererbt werden (HOFFMANN 2006).

SNPs werden auch als "erfolgreiche" Punktmutationen bezeichnet, d.h. als genetische Veränderungen an einem Punkt der DNA-Sequenz, die sich zu einem gewissen Grad im Genpool einer Population durchgesetzt haben (DEPNER 2009). SNPs in kodierenden Bereichen der DNA lassen sich in synonyme und nicht-synonyme kodierende SNPs unterteilen (HUMENY 2001). Bei synonymen SNPs kommt es durch die Basensubstitution nicht zu einer Änderung der kodierten Aminosäure. Nicht-synonyme SNPs bewirken einen Aminosäureaustausch im Genprodukt (DEPNER 2009). Dies kann Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben, es kann sogar sein, dass ein nicht synonymer SNP die Krankheit auslöst, die mit der Genvariante verbunden ist (PETERS 2003). Desweiteren können SNPs in den Regulationsbereichen von Genen liegen, die sich vor und nach jedem Gen befinden. Zudem können sich SNPs in den Introns befinden, d.h. in den nicht abgelesenen Zwischenstücken der Gene. Auch diese SNPs können die Funktion des Gens verändern, wenn sie z.B. in Erkennungssequenzen für Enzyme liegen (PETERS 2003). Der Großteil der SNPs ist aber in nicht funktionellen genomischen Regionen lokalisiert (HUMENY 2001). Solche SNPs ohne funktionellen Einfluss können als genetischer Marker eingesetzt werden, jedoch nur wenn sie sich in der Nähe von Genen befinden, d.h. in einem Abstand der Kopplung zulässt (PETERS 2003).

Die wissenschaftliche Bedeutung von SNPs liegt in ihrem häufigen Auftreten und ihrer hohen Variabilität, außerdem sind sie schnell und relativ einfach zu bestimmen (DEPNER 2009). Desweiteren werden SNPs z.B. zur Aufklärung von Erbkrankheiten oder in der Forschung zur Medikamentenverträglichkeit eingesetzt (HOFFMANN 2006). SNPs werden als genetische Marker bei der Suche nach Chromosomenabschnitten mit Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen Merkmals (sog. Quantitative Trait Loci; s. Kap. 2.3.6, S. 27), wie z.B. Leistung und Exterieur in der Tierzucht genutzt (NICHOLAS 2010a). Das Auffinden von QTLs durch sogenannte Gesamtgenomscans (s.u.) ist der erste Schritt bei der Identifizierung von Genen für quantitative Merkmale. Dabei werden chromosomale Abschnitte bestimmt, in denen sich mögliche Kandidatengene befinden (NICHOLAS 2010c).

2.4.5 Gesamtgenomscan

Bei einem Gesamtgenomscan werden eine Vielzahl gleichmäßig über das gesamte Genom verteilte genetische Marker (z.B. SNPs) auf Kopplung oder Assoziation zu einem bestimmten Merkmal überprüft (GERBER et al. 2008). Kopplung bezieht sich dabei auf Genloci, was heißt je näher Genloci auf demselben Chromosom beieinander liegen, desto häufiger werden sie gemeinsam (gekoppelt) vererbt. Die gemeinsame Vererbung von Allelen an verschiedenen Genloci wird dagegen als Assoziation bezeichnet. Der Begriff Allel bezeichnet eine oder mehrere alternative Formen eines Gens am selben Genlocus (PASSARGE 2008b). Im Gegensatz zu einem Kandidatengenansatz, bei dem gezielt Gene mit einer vermuteten Funktion in der Physiologie oder Pathologie des Merkmals untersucht werden, ist ein Gesamtgenomscan hypothesenfrei (GERBER et al. 2008). Mit Hilfe der Chip-Technologie wird eine Genotypisierung aller Probanden durchgeführt. SNPs werden als genetische Marker eingesetzt, da diese relativ leicht zu typisieren sind und umfangreich im Genom vorkommen. Dabei werden einzelsträngige DNA-Stücke als Fänger auf einem Trägermaterial (Silikon, Nylon, Glas) aufgebracht und mit i.d.R. fluoreszenzmarkierter Probanden-DNA hybridisiert. Bei komplementärer Basenabfolge bindet die Untersuchungsprobe an die DNA auf dem Chip. Die Sichtbarmachung der Bindungssignale erfolgt z.B. durch Laser-Scan-Mikroskopie. Die Auswertung der unterschiedlichen Hybridisierungsintensitäten und die Bestimmung des Genotyps geschieht mit Hilfe aufwendiger, spezialisierter Datenverarbeitungsprogramme (DEPNER 2009).

Die Vielzahl der genetischen Informationen nach Genotypisierung muss statistisch ausgewertet werden. Es stehen dazu genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Verfügung, welche die Ausprägung eines bestimmten Erscheinungsbildes in Relation zu Variationen von genetischen Markern testen. In genomweiten Kopplungsstudien wird dagegen die Vererbung ausgewählter Marker bei erstgradigen Verwandten untersucht. Der große Fortschritt von GWAS gegenüber Kopplungsanalysen ist, dass durch sie auch kleinere Effekte aufgedeckt werden können und sie Loci in einer zuvor nicht erreichbaren Dichte über das gesamte Genom bestimmen können (DEPNER 2009). GWAS werden meist als Fall-Kontroll-Studien durchgeführt. Dabei wird eine große Anzahl von betroffenen Individuen bzw. der Phänotyp von Interesse mit gesunden bzw. geeigneten Kontrollen, bezogen auf ihre SNP-Assoziation zum

untersuchten Erscheinungsbild, verglichen (DEPNER 2009). Zielparameter ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die überprüften genetischen Marker eine Assoziation zur Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen.

2008 wurde der erste kommerzielle SNP-Chip für das Pferd von Illumina® in Zusammenarbeit mit dem International Equine Genome Mapping Workshop und dem Morris Animal Foundation`s Equine Genome Consortium entwickelt. Der EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) beinhaltet 54.602 SNPs, die laut Herstellerangaben als hoch informative SNPs bezeichnet werden und gleichmäßig über das gesamte Pferdegenom verteilt sind. Diese SNPs konnten bisher für 15 Pferderassen validiert werden. SNP-Chips sind auch aus der Sicht unabhängiger Wissenschaftler hervorragend für Gesamtgenomscans geeignet und werden zunehmend zur Untersuchung erblich bedingter Erkrankungen des Pferdes genutzt (BROSNAHAN et al. 2010) (s. Kap. 4.2.4, S. 77-78 und Kap. 4.2.3).

Gesamtgenomscans sind auch geeignet die genetische Prädisposition für komplexe, multifaktoriell bedingte, polygenetische Erkrankungen aufzudecken. In der Humanmedizin waren GWAS beim humanen Asthma erstmals 2007 (MOFFATT et al. 2007) erfolgreich in der Identifizierung von Kandidatengenen und bei der COPD erstmals 2009 (PILLAI et al. 2009).

Die Identifizierung der für die equine COB verantwortlichen Gene würde es ermöglichen durch eine selektive Zucht die COB-Prävalenz zu reduzieren. Mit Hilfe von genetischen Markern könnte der Züchter das COB-Risiko gegenüber anderen erwünschten Merkmalen bewusst abwägen (GERBER et al. 2008). Bei frühzeitiger Identifikation prädisponierter Equiden mittels genetischer Untersuchungsmethoden könnte eventuell durch rechtzeitig optimierte Haltungsbedingungen eine Erkrankungsmanifestation vermieden werden. Schließlich würde das Auffinden genetischer Faktoren mit Einfluss auf die COB zu einem besseren Verständnis der COB-Pathophysiologie beitragen. Dadurch könnten neue Therapieansätze entwickelt werden, vorhandene Behandlung optimiert und die Prophylaxe verbessert werden.

Das Ziel der eigenen Studie war es daher, in einer Fall-Kontroll-Studie mit der equinen COB assoziierte SNPs zu identifizieren. Hierfür wurde ein Gesamtgenomscan mit 54602 SNPs (EquineSNP50 Genotyping BeadChip,

Literaturübersicht

Illumina®, San Diego, USA) eingesetzt. Dadurch sollten QTLs bestimmt werden, die mögliche Kandidatengene der COB-Pathogenese enthalten.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Patienten

3.1.1.1 Einschlusskriterien

In die Studie wurden ausschließlich Warmblutpferde aus der Schweiz und aus Deutschland einbezogen. Es wurde auf einen möglichst geringen Verwandtschaftsgrad der Tiere zueinander geachtet, d.h. die Pferde durften bis einschließlich in die Großelterngeneration keine Verwandtschaft aufweisen. Die Überprüfung der Abstammung erfolgte anhand der Eintragung im Equidenpass oder anhand der Abstammungsurkunde. Es wurde eine Einteilung in chronisch lungenkranke Pferde und lungengesunde Kontrollpferde vorgenommen. Die Zuordnung in die jeweilige Gruppe wurde durch einen standardisierten Fragebogen (s.u.) definiert. Alle Pferde mussten Zugang zu trockenem Heu haben bzw. vor krankheitsbedingter Haltungsänderung gehabt haben. Die chronisch lungenkranken Pferde mussten mindestens sechs Jahre alt sein und es wurde eine Mindestdauer der respiratorischen Symptomatik von zwei Monaten gefordert (Chronizität). Für die Kontrolltiere wurde ein Mindestalter von 15 Jahren festgelegt. Diese hohe Mindestaltergrenze soll dazu beitragen, falsch-negative Kontrolltiere, insbesondere solche, die relativ spät im Leben an COB erkranken, zu vermeiden. Es wurden Stuten, Wallache und Hengste in die Studie aufgenommen. Ein Teil der Probanden, sowohl der Kranken als auch der Gesunden, stammte aus dem Patientenkollektiv der Klinik für Pferde, Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen sowie der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern. Die restlichen Pferde wurden über Vermittlungen durch Haustierärztinnen/Haustierärzte bzw. über direkte Anfragen an Pferdebesitzer/innen oder mittels Aushängen in Reitanlagen rekrutiert.

3.1.1.2 Standardisierter Fragebogen (HOARSI)

Die Einteilung der Pferde in chronisch lungenkranke Fälle mit COB und lungengesunde Kontrollen erfolgte durch Auswertung eines standardisierten Fragebogens. Aufgrund der Antworten der Besitzer konnte ein Horse Owner

Assessed Signs Index (HOARSI) erstellt werden, welcher detailliert von RAMSEYER et al. 2007 beschrieben wurde. Die Klassifikation der Kranken basierte jeweils auf dem Zeitraum der schlimmsten klinischen Symptomatik. Gesunde Kontrollen durften insgesamt nie länger als zwei Wochen Husten gehabt haben. Dies wurde im Sinne einer möglichen akuten respiratorischen Infektion eingeräumt. Die persönliche Befragung der Besitzer oder Tierhalter wurde von vier dafür trainierten Tierärztinnen durchgeführt. Das Beantworten der Fragen erfolgte in einem 20-30 minütigen Gespräch direkt vor Ort oder telefonisch. Gefordert wurde, dass Besitzer oder Halter die Pferde zumindest ein Jahr lang kannten, um die Zuverlässigkeit der Aussagen allgemein zu erhöhen. Zudem sollte so ein eventuell lediglich saisonales Auftreten einer Atemwegsproblematik erfasst werden können. Es wurden genaue Angaben zum Signalement und zur Abstammung aufgenommen, sowie Daten zu Haltung und Fütterung, zum Verwendungszweck, zum Impf- und Entwurmungsmanagement, zur Besitzdauer und zu weiteren Krankheiten außer der des Atmungsapparates erhoben. Auf Erkrankungen des Respirationstraktes wurde detailliert eingegangen, immer bezogen auf den Zeitraum der schlimmsten Atemwegsproblematik. Dabei wurden die Besitzer bzw. Tierhalter gebeten die Symptome und die Dauer der Atemwegserkrankung exakt zu beschreiben. Zudem wurden Fragen zu Leistungseinschränkungen, zur Wiederberuhigung nach Belastung und zur Motivation des Pferdes, zum zeitlichen Auftreten und eventueller Saisonalität, zu tierärztlichen Untersuchungen und Behandlungen, zu Haltungsänderungen und zum aktuellen klinischen Zustand gestellt. Die Informationen wurden anhand von HOARSI nach folgendem Schema zusammengefasst:

- HOARSI 1 Keine Anzeichen einer chronischen respiratorischen Erkrankung (lungengesunde Kontrollpferde)
- HOARSI 2 Milde respiratorische Symptomatik: muköser Nasenausfluss vorhanden und/oder gelegentlich Husten (unklare Atemwegsproblematik - nicht in die Studie einbezogen)
- HOARSI 3 Mittelgradige respiratorische Symptomatik: regelmäßig (einmal täglich) bis ständig (mehrmals täglich) Husten ohne Leistungsminderung und/oder angestrengte Atmung für länger als acht Wochen (chronisch lungenkranke Pferde mit COB)

HOARSI 4 Hochgradige respiratorische Symptomatik: regelmäßig (einmal täglich) bis ständig (mehrmals täglich) Husten mit Hustenanfällen, schlechte Leistung und/oder angestrengte Atmung für länger als acht Wochen (chronisch lungenkranke Pferde mit COB)

Ausschließlich HOARSI 3 und 4 wurden als chronisch lungenkranke Fälle mit COB in die Studie aufgenommen. Alle lungengesunden Kontrollen mussten als HOARSI 1 kategorisiert worden sein. Pferde mit Einstufung in HOARSI 2 wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen. Konnte der HOARSI-Fragebogen aufgrund mangelnder Informationen nicht vollständig ausgefüllt werden, war die Aufnahme in die Studie nicht möglich. Weitere Ausschlusskriterien wurden nicht festgelegt. Aktuelle Behandlungen sowie zusätzliche akute oder chronische Erkrankung waren für die Aufnahme in die eigenen genetischen Untersuchungen nicht von Bedeutung.

3.1.1.3 Auswertung von HOARSI-Informationen

Durch den HOARSI-Fragebogen wurde für jedes Pferd die individuelle Ausprägung zahlreicher Erscheinungsbilder erfasst. Wie bereits bei RAMSEYER et al. (2007) wurden aus diesen Angaben insgesamt sieben sogenannte Phänotypen in Bezug auf die Lungengesundheit der Pferde erstellt. Im Einzelnen waren das Husten, muköser Nasenausfluss, erschwerte (Aus-) Atmung bei Belastung, erschwerte (Aus-) Atmung in Ruhe, verlangsamte Wiederberuhigung nach Belastung, Leistungsmangel und verminderte Leistungsbereitschaft (Motivation).

Zur semiquantitativen Auswertung der Besitzerangaben zu den Erscheinungsbildern wurden diese für die eigenen Auswertungen mit Score-Punkten bewertet. Dabei wurde die Null für das physiologische Erscheinungsbild vergeben, die pathologisch veränderten Varianten wurden je nach Ausprägungsgrad mit aufsteigenden Ziffern belegt, z.B. für Husten: 0 = *kein Husten*, 1 = *gelegentlich Husten*, 3 = *regelmäßig (einmal täglich) Husten*, 5 = *ständig (mehrmals täglich) Husten mit Hustenanfällen*. Eine Übersicht gibt Tabelle 3. Husten stellt beim Pferd ein sehr offensichtliches Symptom einer Atemwegsproblematik dar, weil bekannt ist, dass regelmäßiger Husten vor allem bei Pferden auftritt, die stark von einer COB betroffenen sind (FEY 2006). Zudem wird Husten sicher von den Besitzern erkannt. Um dieser Tatsache

entsprechend Rechnung zu tragen, wurde bei Husten eine gestufte Bewertung mit null, eins, drei und fünf gewählt. Eine erschwerte (Aus-) Atmung, ob bei Belastung oder in Ruhe, spricht für eine deutliche Atemwegsobstruktion. Sie wird jedoch weniger zuverlässig von Besitzern wahrgenommen als Husten. Aus diesem Grund wurde die angestrenzte Atmung bei Belastung nur mit maximal zwei Punkten bewertet. Da eine Ruhedyspnoe als noch schwerwiegender zu beurteilen ist als eine Dyspnoe unter Belastung wurde dafür eine Punktzahl von drei vergeben. Für Wiederberuhigung nach Belastung, Leistung und Motivation wurden nur niedrige Ziffern wie eins und zwei bei pathologischen Abweichungen eingesetzt. Der interindividuelle Vergleich ist diesbezüglich äußerst schwierig, da keine Standardisierung der retrospektiv erhobenen Angaben herangezogen werden konnte. Zudem können zahlreiche weitere Faktoren außer einer chronisch obstruktiven Bronchiolitis wie z.B. Herz-Kreislauf-erkrankungen, Lahmheiten, Stoffwechselerkrankungen oder Übergewicht Einfluss auf Wiederberuhigung, Leistung und Motivation des Pferdes haben.

Tab. 3: Score-Punktverteilung für Angaben aus Fragebogen

Sog. Phänotyp	Erläuterung	Score-Punkte
Husten	<i>kein Husten</i>	0
	<i>gelegentlich</i>	1
	<i>regelmäßig</i>	3
	<i>ständig</i>	5
Muköser Nasenausfluss	<i>fehlend</i>	0
	<i>vorhanden</i>	1
Atmung bei Belastung	<i>normal</i>	0
	<i>angestrengt</i>	2
Atmung in Ruhe	<i>normal</i>	0
	<i>angestrengt</i>	3
Wiederberuhigung	<i>normal</i>	0
	<i>langsam</i>	1
	<i>sehr langsam</i>	2
Leistung	<i>sehr gut</i>	0
	<i>gut</i>	0
	<i>ausreichend</i>	1
	<i>schlecht</i>	2
Motivation	<i>sehr gut</i>	0
	<i>gut</i>	0
	<i>ausreichend</i>	0
	<i>schlecht</i>	1

Durch Addition der jeweils zugeteilten Punkte ließ sich der Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index Score (HOARSI-Score) berechnen. Dieser Score ermöglichte es, den Pferden in den drei Gruppen HOARSI 1, HOARSI 3 oder HOARSI 4 eine individuelle Score-Punktzahl zuzuordnen.

Als HOARSI 1 (lungengesunde Kontrollen) wurden nur Pferde eingestuft bei denen jegliche Anzeichen einer COB fehlten, d.h. diese Pferde mussten bei den atemwegsspezifischen Kriterien *Husten*, *Nasenausfluss*, *angestrengte Ausatmung*

bei Belastung und *angestrengte Atmung in Ruhe* jeweils mit Null bewertet worden sein. Insgesamt durften Pferde in HOARSI 1 höchstens zwei Punkte erreichen, da eingeräumt wurde, dass die Leistung von den Besitzer nur als *ausreichend* und die Motivation als *schlecht* beurteilt werden konnte.

In die Studie als COB-Patient eingeschlossen wurden Pferde, die bei den atemwegsspezifischen Erscheinungsbildern *Husten*, *Nasenausfluss*, *angestrengte Atmung bei Belastung* und *angestrengte Atmung in Ruhe* wenigstens vier Punkte erhielten. Die maximal erreichbare Punktzahl lag bei 16. Pferde, die mit vier bis sieben Punkten bewertet wurden zählten zu HOARSI 3, bei acht bis 16 Punkten ergab sich eine Einteilung in HOARSI 4.

Alle Pferde erhielten bei Aufnahme in die Studie eine fortlaufende Nummer. Diese diente der Identifizierung und der eindeutigen Zuordnung von Phänotypangaben und Genotypinformationen. Für den Gesamtgenomscan mussten sämtliche Informationen aus dem Fragebogen ebenfalls mit Hilfe von Zahlen- und Buchstabenschlüsseln für die weitere genetische Analyse kodiert werden.

Zusätzlich zur Klassifizierung der Pferde in HOARSI 1, 3 und 4 war für jedes Erscheinungsbild aus Tab. 1 eine individuelle Zuordnung der Pferde entweder zur Fall- oder zur Kontrollgruppe möglich. Diese Einteilung war Voraussetzung für die anschließende Berechnung von genomweiten Phänotypassoziationen zu den einzelnen Symptomen (s. Kap. 3.2.4, S. 47-48 und Tab. I, Anhang S. 117-118). Dabei wurde die Null den Kontrollen zugeteilt und alle aufsteigenden Ziffern den Fällen. So erhielten z.B. alle Pferde, die in Ruhe eine normale Atmung aufwiesen die Null und zählten damit für dieses Erscheinungsbild zu den Kontrollen.

Für Angaben zum Zuchtland, welche zur Berechnung von multidimensionalen Skalierungen erforderlich waren, wurde das internationale Länderkürzel verwendet. Desweiteren wurde die Fellfarbe mit Zahlen kodiert, da diese als interne Kontrolle in die Berechnung der genomweiten Assoziationsstudien einbezogen wurde. Dabei stand die eins für eine braune Fellfarbe, die zwei für fuchsfarben. Schimmel erhielten die drei und alle anderen Fellfarben die vier.

3.1.1.4 Klinische Untersuchung

Durch eine Tierärztin wurde das Signalement des Pferdes aufgenommen und die allgemeine klinische Untersuchung sowie die spezielle Untersuchung des Respirationstraktes durchgeführt. Die spezielle Untersuchung des Atmungsapparates erfolgte in Ruhe und der Schwerpunkt wurde auf folgende Parameter gelegt: Atemtyp und -frequenz bzw. Ruhedyspnoe, spontaner Husten, Auslösbarkeit von Hustenstößen durch manuellen Druck auf die ersten Trachealspangen, Nasenausfluss, Vorhandensein nasaler Depigmentierungen als Zeichen für chronischen Sekretfluss, Auffälligkeiten bei der Lungenauskultation. Desweiteren wurden beide Jugularvenen speziell auf Anstaubarkeit, Blutabfluss und eventuelle Verdickungen hin untersucht. Dabei waren die aktuellen Befunde der speziellen Untersuchung des Atemapparates der Pferde mit einer chronischen Atemwegsproblematik bei vielen Tieren nicht ausschlaggebend für die Einteilung, da die Klassifikation in HOARSI 3 und 4 auf dem Zeitraum der schlimmsten respiratorischen Symptomatik nach den Besitzerangaben basierte. Dagegen wurde kein Pferd als HOARSI 1 akzeptiert, wenn es in der klinischen Untersuchung Anzeichen einer COB aufwies.

3.1.1.5 Blutprobenentnahme

Eine Blutprobenentnahme erfolgte nach der allgemeinen Untersuchung und den speziellen Untersuchungen an einer der beiden Venae jugulares am Übergang des mittleren in das obere Halsdrittel. Nach dreimaliger oberflächlicher Desinfektion der Haare und der Haut mit 70%igem Ethanol wurde ein steriler und pyrogenfreier intravenöser Katheter (Vasuflo® -T, 75x51mm, Dispomed, Deutschland) kopfwärts in die Halsvene vorgeschoben. Der Mandrain wurde nach korrekter Platzierung in der Vene entfernt und ein pyrogenfreier Adapter (Sarstedt, Deutschland) auf die Öffnung der Vasuflo® aufgesetzt. Es wurde jeweils eine 9ml EDTA-Monovette (Sarstedt, Deutschland) mittels eines zuvor erzeugten Vakuums befüllt. Nach Abdrücken der Vena jugularis proximal der Punktionsstelle wurde die Vasuflo® aus der Vene entfernt und der Stau für weitere 60 Sekunden gehalten. Die gefüllten Blutröhrchen wurden direkt nach der Blutentnahme einige Male vorsichtig geschwenkt und danach in einem Transportgefäß bei Umgebungstemperatur untergebracht.

3.1.1.6 Blutprobenverarbeitung und -lagerung

Alle in Deutschland gesammelten Blutproben wurden bis spätestens vier Stunden nach Entnahme in den Räumlichkeiten der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen weiter verarbeitet. Das Blut in den 9ml EDTA-Monovetten wurde mit Hilfe einer Pipette je zur Hälfte in zwei 4,5ml Cryoröhrchen (Sarstedt, Deutschland) überführt. Die Cryoröhrchen wurden zuvor zur Identifikation mit einer fortlaufenden Nummer sowie Besitzernamen, Pferdenamen und dem Datum der Blutentnahme gekennzeichnet. Die Cryoröhrchen wurden dann bei minus 20°C tiefgefroren und bis zum Transport nach Bern für höchstens 8 Monate gelagert. Das Überbringen der Blutproben von Gießen nach Bern erfolgte in gefrorenem Zustand auf Trockeneis in einer Styroporbox innerhalb von fünf Stunden. Bis zur weiteren Aufarbeitung d.h. der DNA-Isolation durch das genetische Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern wurden die Proben bei minus 20°C weiter tiefgefroren gelagert.

Die Blutprobenentnahme und -kennzeichnung von Pferden in der Schweiz erfolgte durch drei Tierärztinnen in sehr ähnlicher Weise wie unter Kap. 3.1.1.5 (s. S. 43) beschrieben. Es wurden ebenfalls 9ml EDTA-Monovetten mit Blut befüllt. Die weitere Aufarbeitung, d.h. die Isolierung der DNA wurde entweder unmittelbar nach Blutabnahme und Transport der Blutproben nach Bern am genetischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern durchgeführt oder nach Lagerung der Blutproben bei minus 20°C.

3.2 METHODEN

3.2.1 Isolierung von DNA aus EDTA-Blut

Die Isolierung der DNA aus EDTA stabilisiertem Blut wurde am genetischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern durchgeführt. Es wurde dafür das Nucleon™ BACC2-Kit (GE Healthcare bzw. Amersham Biosciences Europe GmbH, Schweiz) verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Nach Zellyse durch Reagenz A und Reagenz B (im Kit enthalten) erfolgte eine Proteinausfällung mit Natrium-Perchlorat. Durch Zugabe von eisgekühltem Chloroform wurde die DNA extrahiert, mit 100%igem Ethanol gefällt und danach mit 70%igem Ethanol gereinigt. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in TE-Puffer (s.u.) aufgenommen.

Verwendete Chemikalien:

Reagenz A und Reagenz B sowie Natrium-Perchlorat sind im Kit enthalten

Chloroform 100 % (Fluka, Schweiz)

Ethanol 100 % und Ethanol 70 % (Fluka, Schweiz)

TE-Puffer: 10 mM TrisHCl (pH 7,5-8,8); 1mM EDTA (pH 8,0)

Die Konzentrationsmessung (ng/μl) der vollständig in TE-Puffer resuspendierten DNA erfolgte mit Hilfe des Spectrophotometers ND 1000 (NanoDrop™, Thermo Fischer Scientific, Schweiz) durch Messung der Extinktion bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum stickstoffhaltiger Basen. Zusätzlich wurde die Extinktion bei 280 nm bestimmt um mögliche Verunreinigungen der Probe mit Proteinen zu ermitteln. Der Quotient $E_{260/280}$ gibt die Reinheit der Probe an und sollte für saubere DNA-Präparationen bei einem Wert zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Zur weiteren Qualitäts- und Konzentrationskontrolle erfolgte eine Auftrennung aller DNA-Proben mittels Gelelektrophorese (BIO-RAD, Power PAC 3000, Schweiz) auf 0,7%igem Agarose-Gel, um Kontaminationen mit RNA oder Phenol auszuschließen. Nach Färbung, UV-Bestrahlung und Messung der Fluoreszenz wurde die DNA-Konzentration anhand der Bandenintensität im Vergleich zu einer kommerziell standardisierten Lambda-DNA bestimmt.

3.2.2 SNP-Chip-Untersuchung (Illumina SNP50 Genotyping Bead Chip)

Die Single Nucleotide Polymorphism-Chip-Untersuchung (SNP-Chip-Untersuchung) ist eine Genotypisierungsmethode, die das Ziel hat, Variationen in der DNA-Sequenz in spezifischen Genen oder chromosomalen Regionen zu identifizieren.

Die DNA-Chip-Technologie nutzt Techniken aus der Halbleiterfertigung. Winzige Plastik- oder Glasplättchen werden mit einzelsträngigen DNA-Stücken, welche die zu überprüfenden SNPs enthalten, als Sonden beschichtet und auch als Mikroarray bezeichnet. Durch Zugabe der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Untersuchungsprobe, der sogenannten Hybridisierung, bindet die Ziel-DNA bei komplementärer Basenfolge an die DNA auf dem Chip. Die Position, die Intensität und die Wellenlänge der entstandenen Mischfarbe werden mit einer hochauflösenden Laserkamera detektiert. Dabei entsteht eine Serie von Hybridisierungsintensitäten, welche durch spezialisierte Datenverarbeitungsprogramme in den aktuellen Genotyp übersetzt werden.

Alle 364 DNA-Proben wurden mittels Equine SNP50 Genotyping Bead Chip (Illumina®, San Diego, USA) am Animal Health Trust in Newmarket untersucht. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Für jedes Individuum wurden jeweils 54.602 SNPs überprüft. Aus den Signalen bei komplementärer Bindung wurden die Genotypinformationen für jedes Pferd berechnet und anschließend zur Verwaltung und Archivierung der Datenbank BC/GENE (BC Platforms) zugeführt. Zudem wurden sämtliche Phänotypangaben der 364 Pferde in denselben Datenspeicher aufgenommen. Die Angaben zum Phänotyp wurden wie in Kap. 3.1.1.3 (s. S. 39-42) beschrieben mit Score-Punkten bewertet bzw. mit Buchstaben verschlüsselt und BC/GENE zugestellt. Mittels einer sogenannten Masternummer erfolgte die Zuordnung der Daten sowohl zum Phänotyp als auch zum Genotyp.

Die Plattform BC/GENE stellt ebenfalls sämtliche für die weitere Datenanalyse erforderliche Software zur Verfügung. Durch die Kombination der Genotypinformationen mit den jeweiligen Phänotypangaben wurden mit Hilfe der PLINK v1.07 Software in BC/GENE zahlreiche mehrdimensionale Skalierungen (MDS) und genomweite Assoziationsstudien (GWAS) berechnet.

3.2.3 Multidimensionale Skalierungen (MDS)

Mit Hilfe der Software PLINK v1.07 (PURCELL et al. 2007) wurde die Berechnung von mehrdimensionalen Skalierungen aus den Genotypinformationen aller nicht verwandten 364 Individuen durchgeführt.

Die multidimensionale Skalierung (MDS), auch Ähnlichkeitsstrukturanalyse genannt, ist ein multivariates Verfahren der Datenanalyse, bei der in der vorliegenden Arbeit die genetische Ähnlichkeit zwischen zwei Pferden jeweils durch ihre Distanz zueinander beschrieben wurde. Je weiter die Tiere in der MDS voneinander entfernt sind, desto geringer ist ihre genetische Gleichartigkeit und je näher sie einander sind, desto genetisch ähnlicher sind sie sich.

Für die Ergebnisdarstellung wurde eine zweidimensionale Abbildung dieser Distanzen zwischen den Individuen gewählt. Die Genotypinformation der Pferde wurde dabei als Punkt in einem Koordinatensystem in Excel dargestellt. Aus der Gesamtheit aller Daten ergab sich eine Punktwolke, die auch als MDS-Plot oder Scatterplot bezeichnet wird (s. Abb. 1, S. 54).

Überprüft wurde die genetische Ähnlichkeit aller 364 Pferde untereinander. Zudem wurden die Schweizer Proben mit den in Deutschland gesammelten Proben verglichen sowie alle Fälle gegen alle Kontrollen dargestellt. Desweiteren wurde ein Vergleich der Warmblutpferde nach ihrem Zuchtland (Deutschland, Schweiz, Frankreich, Niederlande) durchgeführt. Da bei einigen Pferden nur das Herkunftsland bekannt war, das Zuchtland bzw. Zuchtgebiet jedoch nicht eindeutig zu ermitteln war, wurden diese in der Berechnung unter „Andere“ zusammengefasst.

3.2.4 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) werden eine Vielzahl genomweit verteilter genetischer Marker auf Kopplung und/oder Assoziation zu einem bestimmten Phänotyp getestet. Das Ziel der eigenen Analysen war es, mit der COB assoziierte SNPs zu identifizieren.

Auf Grundlage der Genotypinformationen aus der SNP-Chip-Untersuchung wurden Assoziationsberechnungen zu HOARSI und zu ausgewählten Phänotypen

durchgeführt. Für jede Assoziationsberechnung wurde eine Fall- und eine Kontrollgruppe definiert. Eine Übersicht über alle in die GWAS eingegangenen Phänotypen und die Einteilung in Fälle und Kontrollen gibt Tab. I (s. Anhang S. 117-118).

In den GWAS wurde für jeden der 54.602 SNPs berechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Assoziation zu den Fällen im Vergleich mit den Kontrollen vorlag. Diese Berechnungen wurden für HOARSI wie auch für die ausgewählten Phänotypen (s.u.) durchgeführt.

3.2.4.1 Auswahl der Phänotypen für die GWAS

Es wurden für alle 364 Pferde die genomweiten Phänotypassoziationen für HOARSI sowie für Husten, mukösen Nasenausfluss, erschwerte Atmung bei Belastung, erschwerte Atmung in Ruhe, Wiederberuhigung, Leistung und Motivation berechnet (s. Kap. 3.1.1.3, S. 39-42 und Tab. I, Anhang S. 117-118).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Analysen wurden in einer weiteren Berechnung ausschließlich HOARSI 4 (n=148) HOARSI 1 gegenübergestellt. Zudem wurde Nasenausfluss nur innerhalb der COB-kranken Pferde getestet. Dabei wurden „COBler“ mit mukösem Nasenausfluss als Fälle (n=153) eingesetzt und „COBler“ ohne ersichtlichen Nasenausfluss als Kontrollen (n=33).

Die Proben wurden weiterhin je nach Rassengruppe zusammengefasst, nämlich einerseits Schweizer und französisches Warmblut (n=139) sowie andererseits deutsches Warmblut (n=140). Für diese beiden Gruppen erfolgte erneut die Berechnung der oben genannten Phänotypassoziationen. Diese Gruppeneinteilung wurde vorgenommen, da bei der visuellen Überprüfung der genetischen Ähnlichkeit mittels MDS-Plot gewisse genetische Unterschiede zwischen den Zuchtländern auffällig schienen (s. Abb. 10, S. 88 und Kap.3.3.3, S. 55-56).

3.2.4.2 Berechnung und Darstellung der GWAS

Mit Hilfe der PLINK v1.07 Software (PURCELL et al. 2007) wurden die einzelnen GWAS als Fall-Kontroll-Studien erstellt. Alle Genotypen und Phänotypen waren in einer BC/Gene Datenbank gespeichert (BC Platforms). Durch Kombination der Genotypinformationen mit den Phänotypangaben erfolgte dabei für jeden der 54.602 SNPs die Berechnung der Wahrscheinlichkeit, mit der die Fälle eine Assoziation im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen.

Für die eigenen Berechnungen wurde eine Minorallelfrequenz (MAF) von 0,01, eine maximale Minorallelfrequenz (Max MAF) von 0,5, eine missingness rate von 1,0 und ein Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) von Null festgelegt. Das Datenverarbeitungsprogramm PLINK v1.07 bietet die Möglichkeit durch die spezifische Einstellung dieser Parameter bestimmte SNPs bei der Analyse von genomweiten Assoziationen ein- oder auszuschließen. Als Allelfrequenz bezeichnet man die Häufigkeit, mit der ein Allel in einer Population an einem gegebenen Genlocus vertreten ist. Die Häufigkeit aller Allele an einem Genlocus beträgt 100% (PASSARGE 2008b). Alle getesteten SNPs haben zwei Allele. Die Minorallelfrequenz bezieht sich auf die Häufigkeit mit welcher das seltenere der beiden Allele in einer Population auftritt (NICHOLAS 2010c). Für die minimale MAF der SNPs wurde hier ein Standardwert von 0,01 (1%) gewählt. Ein Wert von 0,5 für die maximale MAF ergibt sich bei gleicher Häufigkeit von 50% der beiden Allele an einem Markerlocus. Die missingness rate legt fest, welche SNPs aufgrund eines zu niedrigen Genotypisierungsgrades bei der GWAS ausgeschlossen werden können. Standardmäßig werden alle SNPs in die Analyse einbezogen, so auch in den vorliegenden Untersuchungen. Daraus ergibt sich die missingness rate von 1,0. Das Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) beschreibt eine Regel über die Verteilung von Erbmerkmalen in großen Populationen, nach der die ursprünglichen Proportionen von Allelen in allen folgenden Generationen erhalten bleiben (DEPNER 2009). Es wird dabei von einem Gleichgewicht zwischen Häufigkeit einer Mutation und Selektion gegen sie ausgegangen. Vorausgesetzt werden zufällige Paarung, Konstanz der Mutationshäufigkeit und das Fehlen von Migration (PASSARGE 2008b). Da bei der Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in PLINK v1.07 nur „Gründerdaten“ (founder) bzw. Familiendaten berücksichtigt werden, wurde in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie hier Null eingesetzt.

Zur Validierung der Berechnungen und um zufallsbedingte Assoziationen auszuschließen wurde für jede GWAS eine empirische Signifikanz durch 1000 Permutationen der Phänotypen der analysierten Tiere ermittelt. Für sämtliche GWAS wurde zu jedem Marker der errechnete Wahrscheinlichkeitswert als empirischer p-Wert (EMP2) nach Permutation, das Chromosom und die Basenposition in Megabasen angegeben.

Die Visualisierung der genomweiten Assoziationen der SNPs zum jeweiligen Phänotyp erfolgte durch HaploView 4.0 als Manhattan-Plot (s. Abb. 3, S. 58 und Abb. 4, S. 59).

3.2.4.3 Interne Kontrolle der GWAS: Assoziationsberechnung zur Fuchsfarbe

Zur Prüfung der Methode erfolgte eine Assoziationsberechnung zur Fuchsfarbe. Dabei wurden alle fuchsfarbenen Pferde (n=100) als Fälle eingesetzt und alle Pferde mit anderer Fellfarbe (n=263) als Kontrollen. Da die Vererbung der Fuchsfarbe bekannt ist muss sich bei korrekter Berechnung eine signifikante Assoziation zwischen der Fellfarbe Fuchs und dem „Fuchsfarbe-Locus“ auf Chromosom 3 zeigen (s. Kap. 3.3.5, Abb. 8, S. 64).

3.3 ERGEBNISSE

3.3.1 Patientendaten und Gruppenvergleich

Insgesamt wurden 364 Warmblutpferde in die Studie aufgenommen. Die Proben wurden im Zeitraum zwischen 2007 bis 2009 in der Schweiz und in Deutschland gesammelt. Die Anzahl der chronisch lungenkranken Tiere betrug 186. Die Anzahl der gesunden Kontrollen lag bei 178. Als COB-krankte Fälle zählten definitionsgemäß ausschließlich Pferde, welche laut Besitzerangaben in HOARSI 3 und 4 (s. Kap. 3.1.1.2, S. 38-39) eingeteilt wurden. Dabei wurden als Fälle 38 Pferde mit HOARSI 3 (20%) und 148 Pferde mit HOARSI 4 (80%) in die Untersuchungen einbezogen. Alle 178 Kontrollpferde waren mit HOARSI 1 kategorisiert. Die Ergebnisse der Auswertung von Score-Punkten, welche für Besitzerangaben zu COB-typischen Erscheinungsbildern vergeben wurden (s. Kap. 3.1.1.3, S. 39-42), sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Ergebnisse der Auswertung von Besitzerangaben anhand von Score-Punkten für HOARSI

	HOARSI 1	HOARSI 3	HOARSI 4
Mittelwert \pm SD	0,02 \pm 0,13	5,5 \pm 0,98	12,4 \pm 2,23
Minimum	0	4	8
Maximum	1	7	16
Anzahl	178	38	148

Das Alter der kranken Pferde lag zwischen sieben und 31 Jahren bei einem Mittelwert von 15,8 Jahren und einer Standardabweichung von 4,6. Die Kontrollen mussten ein Mindestalter von 15 Jahren aufweisen und zeigten dementsprechend eine Altersspanne von 15 bis 29 Jahren und einen Altersmittelwert von 18,4 Jahren. Aufgrund der Schiefverteilung der Altersdaten bei den Kontrollen wurde hier keine Standardabweichung berechnet. Eine Übersicht u.a. der Geschlechtsverteilung gibt Tabelle 5.

Tab. 5: Gruppenvergleich

	Fälle (n = 186)	Kontrollen (n=178)
Mittelwert des Alters in Jahren \pm SD	15,8 \pm 4,6	18,4
Altersspanne in Jahren	7 - 31	15 - 29
Hengste (n=3)	1	2
Stuten (n=130)	64	66
Wallache (n=231)	121	110

Bei Betrachtung der Pferde in Bezug auf das Zuchtland waren Gruppengrößen wie in Tab. 6 aufgeführt zu verzeichnen:

Tab. 6: Aufteilung der Warmblüter nach Zuchtland

Zuchtland	Anzahl	Fälle	Kontrollen
Deutsches Warmblut	140	76 (54%)	64 (46%)
Schweizer Warmblut (ZVCH)	108	48 (44%)	60 (56%)
Französisches Warmblut (Selle Francais)	31	17 (55%)	14 (45%)
Niederländisches Warmblut (KWPN)	23	14 (60%)	9 (40%)
ohne Angabe zum Zuchtland	62	31 (50%)	31 (50%)
Gesamt	364	186	178

Von den Warmblütern aus der Schweiz gehörten zwei Pferde dem Trakehner Zuchtverband an und die restlichen dem Zuchtverband des Schweizer Warmblut-Sportpferdes (ZVCH). Bei den Pferden aus französischem Zuchtgebiet handelte es sich ausschließlich um Selle Francais, bei den aus niederländischem Zuchtgebiet um KWPN (Koninklijk Warmbloed Paard Nederland). Für die übrigen Warmblüter konnten nur Angaben zum aktuellen Heimatland, jedoch nicht zum Zuchtland bzw. Zuchtgebiet erhoben werden.

Für 135 der 140 Warmblüter mit deutschem Zuchtland lagen zudem Angaben zum Zuchtgebiet vor. Tabelle 7 zeigt die Aufteilung.

Tab. 7: Aufteilung der deutschen Warmblüter nach Zuchtgebiet

Zuchtgebiet Deutsches Warmblut	Anzahl	Fälle	Kontrollen
Hannoveraner	38	23	15
Hesse	37	20	17
Trakehner	15	7	6
Holsteiner	12	5	7
Westfale	12	6	6
Württemberg	7	5	2
Oldenburger	5	4	1
Rheinländer	4	3	1
Zweibrücker	3	2	1
Bayer	1	0	1
Berlin-Brandenburger	1	0	1
Mecklenburger	1	0	1
Thüringer	1	1	0
Unbekannt	5	0	5
Gesamt	140	76	64

3.3.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Keines der Kontrollpferde (HOARSI 1) wies in der klinischen Untersuchung in Ruhe Hinweise bezüglich einer obstruktiven Atemwegsproblematik auf. Da die Befunde der speziellen klinischen Untersuchung des Atemapparates bei den COB-Kranken stark voneinander abwichen und aufgrund der jeweiligen individuellen Ausprägung der Erkrankung (in Exazerbation, aktuell unter Behandlung, in Remission, durch Haltungsänderung seit langem symptomfrei) zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht vergleichbar waren, wurde auf die Angabe dieser Daten verzichtet. Zudem hatte der aktuelle Gesundheitszustand der Pferde innerhalb der COB-Gruppe auf das Ziel der vorliegenden Studie, nämlich die Analyse der für die COB-Prädisposition verantwortlichen Gene, keine Auswirkung.

3.3.3 Ergebnisse der multidimensionalen Skalierungen (MDS-Plots)

In der Darstellung der genetischen Verteilung der 364 Warmblüter als MDS-Plot zeigte sich die Studienpopulation als relativ gleichförmige Punktwolke, in der sich die Pferde dicht um das Koordinatenkreuz herum ansammelten (s. Abb. 1). In allen vier Quadranten entfernten sich lediglich einzelne Pferde von der Punktwolke, bzw. war im linken oberen Quadranten eine kleine Gruppe von Individuen zu verzeichnen, die sich etwas vom Zentrum des Koordinatenkreuzes absetzte. Insgesamt stellte sich die Studiengruppe bei der optischen Überprüfung der genetischen Ähnlichkeit aber als recht einheitliche Population dar.

Bei der Darstellung der aus der Schweiz stammenden Proben (n=248) gegen die Proben aus Deutschland (n=116) konnte eine gleichmäßige Verteilung der Tiere innerhalb der gesamten Punktwolke beobachtet werden (s. Abb. 1).

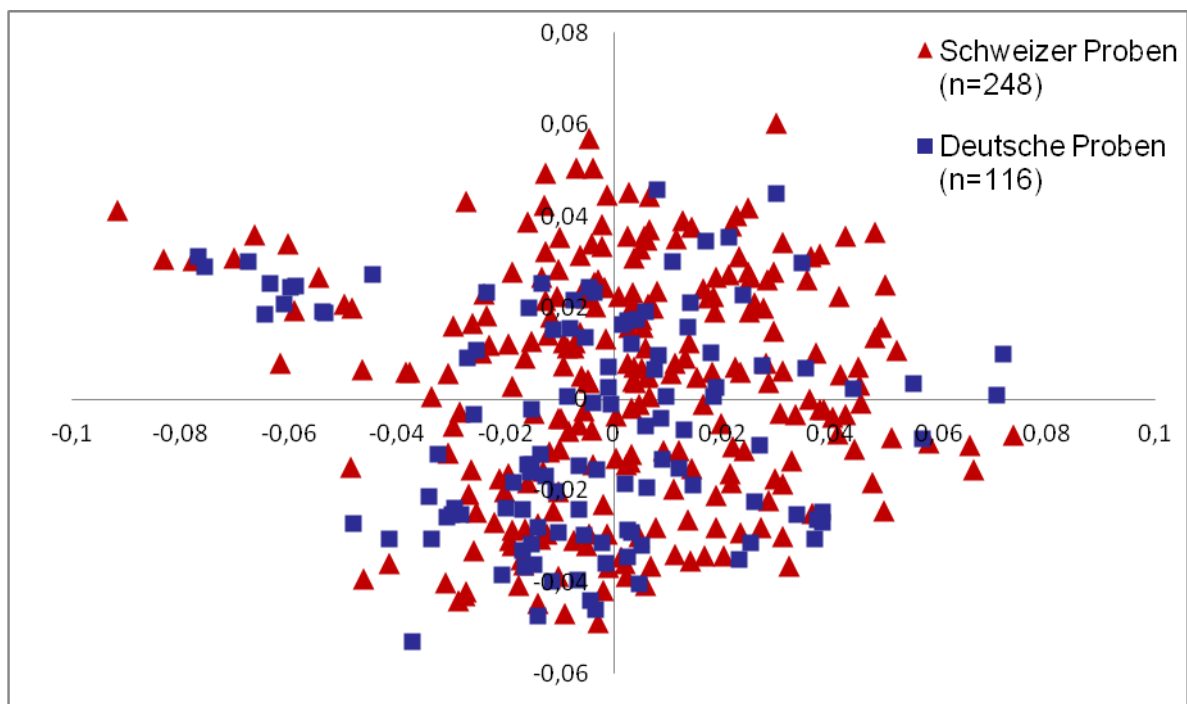


Abb. 1: MDS-Plot der genetischen Verteilung der in der Schweiz (n=248) und in Deutschland (n=116) gesammelten Proben

Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Der Vergleich aller Fälle (n=186) mit allen Kontrollen (n=178) ergab ebenfalls eine homogene Aufteilung der Pferde im MDS-Plot und spricht für die prinzipielle genetische Ähnlichkeit von Fällen und Kontrollen (s. Abb. 2).

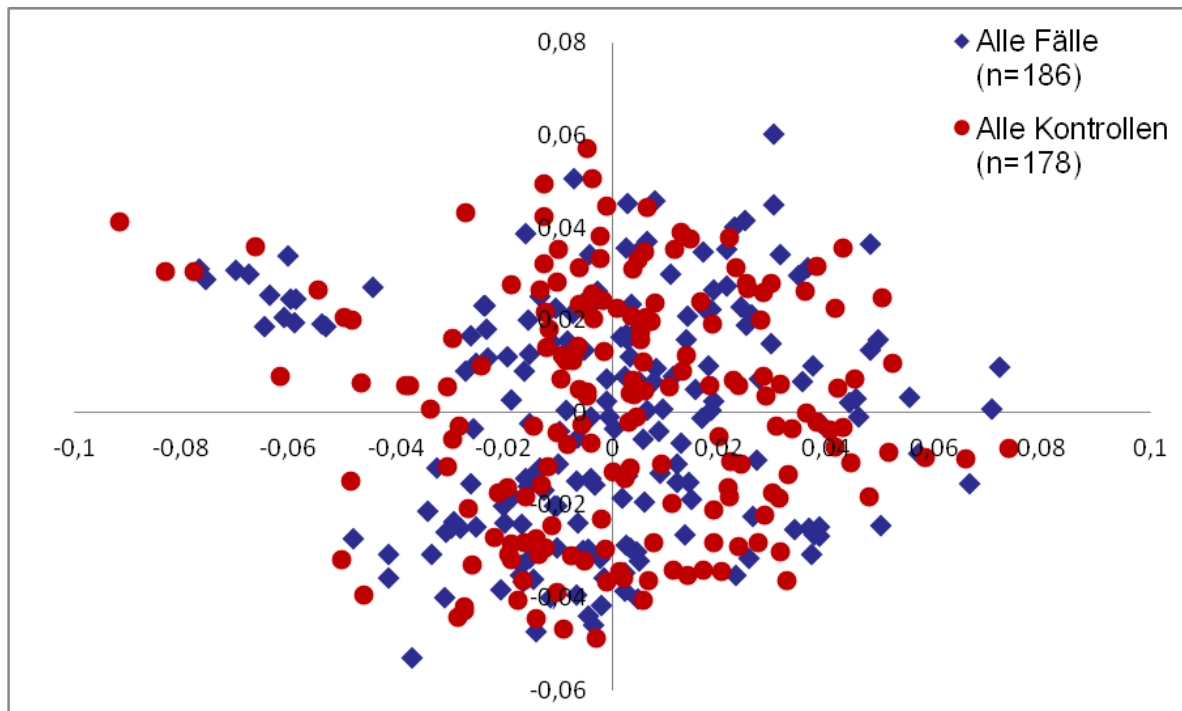


Abb. 2: MDS-Plot der genetischen Verteilung aller Fälle (n=186) und aller Kontrollen (n=178)

In der Gegenüberstellung der Pferde nach ihrem Zuchtland zeichneten sich geringe genetische Unterschiede zwischen den Warmblütern ab (s. Abb. 10, S. 88). Bei 302 Warmblutpferden war das Zuchtland bekannt, für die übrigen 62 Warmblüter konnten nur Angaben zum Herkunftsland, jedoch nicht zum Zuchtland erhoben werden. Es waren hauptsächlich deutsche Warmblüter, Pferde des Zuchtverbandes des Schweizer Warmblut-Sportpferdes (ZVCH), Selle Francais aus Frankreich und KWPN (Koninklijk Warmbloed Paard Nederland) aus den Niederlanden vertreten. Die deutschen Warmblüter als größte Rassengruppe (n=140) zeigten eine Anhäufung in den unteren beiden Quadranten, wohingegen Schweizer Warmblüter (n=108) und Selle Francais (n=31) sich bei relativ hohem Deckungsgrad vorwiegend in den oberen Quadranten ansammelten. Für die KWPN (n=23) konnte eine relativ breite

Verteilung vorwiegend in den beiden oberen Quadranten festgestellt werden. Alle Pferde, für die keine eindeutigen Angaben zum Zuchtland vorlagen, wurden in der Darstellung als MDS-Plot unter „Andere“ (n=62) zusammengefasst. Es zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung dieser Pferde im gesamten Koordinatenkreuz.

3.3.4 Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudien (GWAS)

Für die genomweiten Assoziationsstudien wurde ein Signifikanzniveau von $< 0,05$ für die p-Werte der Phänotyp-Assoziationen festgelegt.

Durch die PLINK Software wurde zu jedem der überprüften 54.602 SNPs das entsprechende Chromosom, die Basenposition in Megabasen (Mb) sowie der statistisch berechnete p-Wert für das Vorliegen einer Assoziation der SNPs zu den Fällen angegeben. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der GWAS sind in Tab. I im Anhang (s. S. 117-118) aufgeführt. Da bei der statistischen Berechnung zahlreiche zufallsbedingte Assoziationen auftreten, wurde für jede GWAS eine empirische Signifikanz durch 1000 Permutationen der Phänotypen ermittelt. Permutieren heißt Vertauschen, Umstellen. Permutation im mathematischen Sinn bedeutet die Umstellung in der Reihenfolge bei einer Zusammenstellung einer bestimmten Anzahl geordneter Größen bzw. von Elementen (DUDEN 2010). Es handelt sich dabei um ein in der statistischen Auswertung genetischer Daten übliches Verfahren. Für jeden SNP wurde daher der endgültig errechnete p-Wert nach Permutation als empirischer p-Wert oder sog. EMP2 aufgeführt.

Zur zweidimensionalen Darstellung der Ergebnisse als Manhattan-Plot wurde der negative dekadische Logarithmus der p-Werte verwendet. Dies dient einer besseren Veranschaulichung der Werte. Je kleiner der p-Wert desto größer ist der entsprechende logarithmierte Wert, wenn der negative dekadische Logarithmus angegeben wird. Das negative Vorzeichen dient der Abbildung der logarithmierten p-Werte ins Positive. Da der negative dekadische Logarithmus von 0,05 gerundet 1,3 beträgt, gilt ein $-\log_{10}(\text{EMP2})$ von $> 1,3$ als signifikant.

In der vorliegenden Studie waren nach Permutationsberechnung für keine der durchgeführten Phänotyp-Assoziationen signifikante Ergebnisse zu verzeichnen.

Gleichwohl werden im Folgenden zwei Beispiele der Phänotyp-Assoziationen als Manhattan-Plot gezeigt, jeweils ohne und nach Permutation. Zuerst wird die Assoziation zu HOARSI für alle 364 Warmblüter aufgeführt. Desweiteren werden beispielhaft die genomweiten Assoziationen zu schlechter Leistung innerhalb der Rassengruppe deutsches Warmblut dargestellt.

In Abb. 3 sind die Ergebnisse der Assoziationsberechnung für HOARSI als Manhattan-Plot ohne Permutation dargestellt. Für die Darstellung der genomweiten Assoziationen für alle 364 Warmblüter wurde HOARSI ausgewählt, da sich dieser Index aus der Gesamtheit aller COB-typischen Erscheinungsbilder ergibt und somit am schärfsten die COB-kranken Fälle von den lungengesunden Kontrollen trennt. In diese Berechnung wurden alle 364 Studienpferde einbezogen. Umso mehr Pferde in einer GWAS getestet werden, desto größer ist die „Power“ der Studie, mit der eine vorhandene Assoziation aufdeckt werden kann.

Die Auftragung der zur besseren Veranschaulichung logarithmierten p-Werte erfolgte auf der y-Achse. Auf der x-Achse sind die 32 equinen Chromosomen repräsentiert. In diesem Beispiel wurde für jeden der 54.602 SNPs berechnet mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Assoziation der SNPs zu HOARSI 3 und 4 (d.h. den Fällen mit n=186) im Vergleich zu HOARSI 1 (d.h. den Kontrollen mit n=178) vorlag. Jedes der in Abb. 3 abgebildeten Quadrate stellt einen der 54.602 SNPs dar, die über das ganze Genom d.h. über die 32 equinen Chromosomen verteilt sind und zeigt deren jeweiligen p-Wert für das Vorliegen einer Assoziation zu HOARSI 3 und 4. Ohne Permutationsberechnung erreichen zahlreiche SNPs in Abb. 4 scheinbar signifikante Werte von $> 1,3$. Auf Chromosom 11 zeigt sich für einen SNP ein im Vergleich zu den übrigen SNPs sogar deutlich erhöhter $-\log_{10}(p)$.

Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

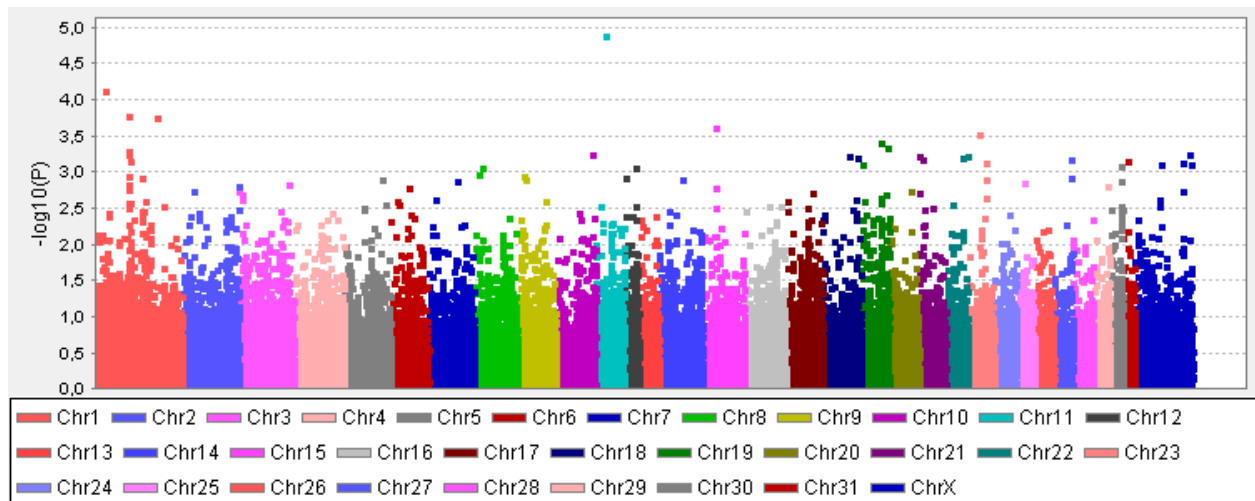


Abb. 3: Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot ohne Permutation für HOARSI für alle 364 Warmblüter (186 Fälle vs. 178 Kontrollen)

In Abb. 4 ist die Permutationsberechnung zum Ausschluss von zufallsbedingten Assoziationen in der Darstellung der Phänotyp-Assoziationen für HOARSI als Manhattan-Plot berücksichtigt. Es bleiben nur ganz vereinzelt Assoziationen übrig. Durch die Permutation wurden die empirischen p-Werte größtenteils auf 1 korrigiert und erscheinen somit nicht mehr im Manhattan-Plot, der den negativen dekadischen Logarithmus der EMP2-Werte abbildet, da $-\log_{10}(1)$ Null ergibt. Ausschließlich Assoziationen die nach Permutation Bestand haben und auf der y-Achse Werte $> 1,3$ erreichen sind als empirisch signifikant zu bewerten. Nach Permutation erreichte kein SNP das geforderte Signifikanzniveau. Mit einem EMP2-Wert von 0,37 bzw. $-\log_{10}(0,37) = 0,43$ fand sich eine Assoziation zwischen dem SNP **BIEC2-143784** auf Chromosom 11 in Basenposition 22Mb und HOARSI.

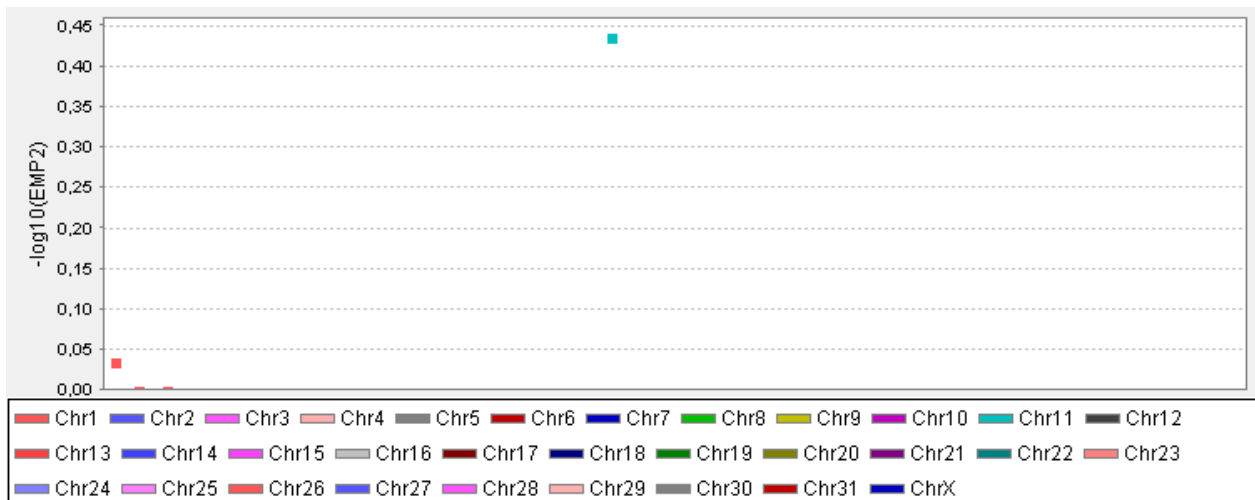


Abb. 4: Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot nach Permutation für HOARSI für alle 364 Warmblüter (186 Fälle vs. 178 Kontrollen): Signifikante Assoziationen erfordern Werte $> 1,3$

Als weiteres Beispiel der Ergebnisdarstellung als Manhattan-Plot sollen die genomweiten Assoziationen zu schlechter Leistung gezeigt werden, da hier der insgesamt kleinste EMP2-Wert von 0,067 (entspricht einem Wert von 1,17 als negativer dekadischer Logarithmus) für das Vorliegen einer Assoziation zu verzeichnen war. Alle weiteren EMP2-Werte für die Phänotyp-Assoziationen lagen relativ weit vom Signifikanzniveau von $< 0,05$ entfernt (s. Anhang, Tab. I, S. 117-118).

Abb. 5 stellt den Manhattan-Plot ohne Permutation für das Erscheinungsbild schlechte Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut dar. Als Fälle wurden 27 deutsche Warmblüter eingeschlossen, die bedingt durch ihre chronische Atemwegsproblematik eine schlechte Leistung aufwiesen. Die Kontrollen waren 81 deutsche Warmblüter mit guter oder sehr guter Leistung. In dieser GWAS wurde berechnet mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Assoziation der SNPs zu den deutschen Warmblütern mit schlechter Leistung vorlag. Wie zuvor beschrieben sind im Manhattan-Plot auf der y-Achse die logarithmierten p-Werte und auf der x-Achse die 32 equinen Chromosomen dargestellt. Die farbigen Quadrate zeigen für jeden der 54.602 SNPs die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Assoziation zu schlechter Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut. Zahlreiche SNPs überschreiten das Signifikanzniveau von $> 1,3$ in der Darstellung als Manhattan-Plot ohne Permutation. Auf Chromosom 10 ist ein vergleichsweise deutlich erhöhter $-\log_{10}(p)$ zu erkennen.

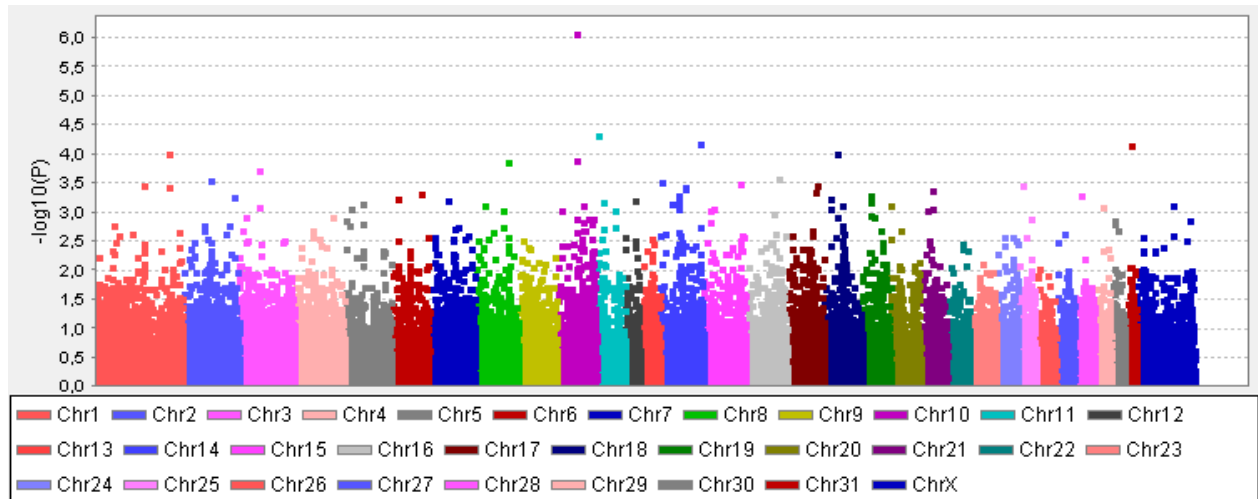


Abb. 5: Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot ohne Permutation für schlechte Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut (27 Fälle vs. 81 Kontrollen)

In Abb. 6 sind die verbleibenden „wahren“ logarithmierten EMP2-Werte nach Permutation für das Vorliegen einer Assoziation der SNPs zu schlechter Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut abgebildet. Keiner der SNPs erreichte dabei das Signifikanzniveau von $>1,3$. Der SNP **BIEC2-118643** auf Chromosom 10 in Basenposition 40Mb wies mit einem EMP2-Wert von 0,067 bzw. $-\log_{10}(0,067) = 1,17$ die höchste Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Assoziation in allen GWAS auf.

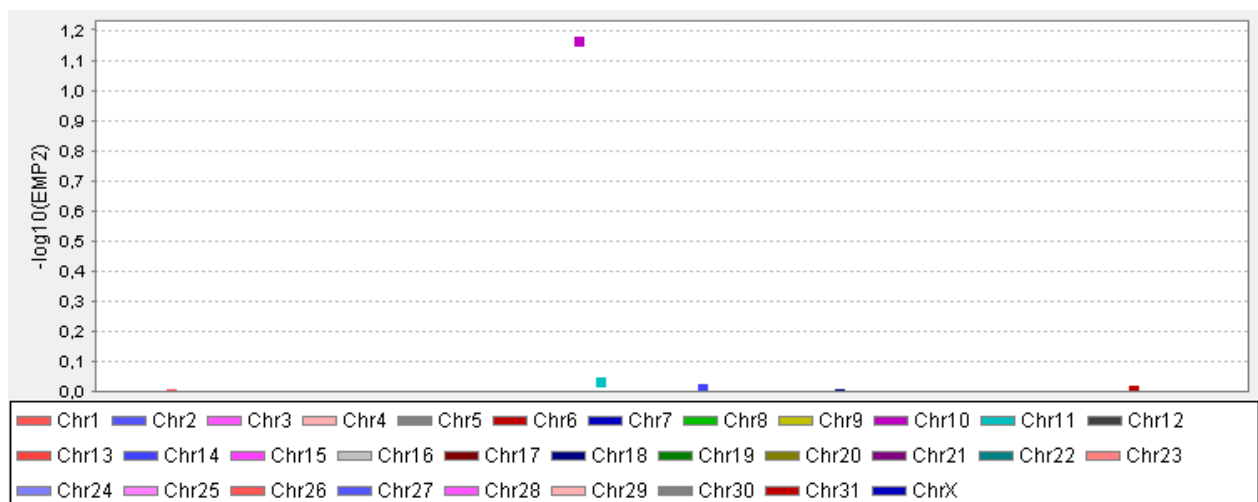


Abb. 6: Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot nach Permutation für schlechte Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut (27 Fälle vs. 81 Kontrollen): Signifikante Assoziationen erfordern Werte $> 1,3$

Insgesamt ist zu beobachten, dass einige der SNPs in unterschiedlichen GWAS mehrfach den kleinsten EMP2-Wert (und damit die höchste Wahrscheinlichkeit) für das Vorliegen einer Assoziation aufwiesen. In den Berechnungen für alle 364 Warmblüter wies der SNP **BIEC2-143784** auf Chromosom 11 sowohl für HOARSI (EMP2 = 0,37) als auch für Husten (EMP2 = 0,38) den niedrigsten empirischen p-Wert auf. In der zusammengefassten Rassengruppe Schweizer und französisches Warmblut war für den SNP **BIEC2-778574** auf Chromosom 3 in Basenposition 40Mb mit einem EMP2-Wert von 0,14 eine Assoziation zu HOARSI zu verzeichnen und mit einem EMP2-Wert von 0,17 eine Assoziation zu Husten. Bei den deutschen Warmblütern zeigte der SNP **BIEC2-118643** auf Chromosom 10 (40Mb) sowohl in den Berechnungen für schlechte Leistung (EMP2 = 0,067) als auch für angestrengte Atmung bei Belastung (EMP2 = 0,42) als auch für verlangsamte Wiederberuhigung (EMP2 = 0,53) jeweils den kleinsten EMP2-Wert für eine Assoziation.

3.3.5 Ergebnisse der internen Kontrolle: GWAS zur Fuchsfarbe

Zur internen Kontrolle der Methode wurde bei den Studienpferden eine Assoziationsberechnung zur Fuchsfarbe durchgeführt. Hierbei wurden alle Füchse (n=100) als Fälle allen Pferden mit anderer Fellfarbe (n=263) gegenübergestellt. Für ein Pferd lag keine Angabe zur Fellfarbe vor, weshalb dieses nicht in die Berechnung der Phänotyp-Assoziation Fuchsfarbe einging. Zu erwarten war ein signifikanter Wert für das Vorliegen einer Assoziation zwischen der Fuchsfarbe und Chromosom 3. In Abb. 7 sind die Phänotyp-Assoziationen als Manhattan-Plot ohne Permutation für die Fuchsfarbe abgebildet mit Auftragung der logarithmierten p-Werte auf der y-Achse und der 32 equinen Chromosomen auf der x-Achse. Hier fällt bereits ohne Permutation eindeutig das Vorhandensein einer Assoziation zu Chromosom 3 auf. Die in Abb. 7 auf Chromosom 3 erreichten logarithmierten p-Werte liegen etwa um das 10-fache erhöht im Vergleich zu den in Abb. 3 und Abb. 5 dargestellten größten Werten.

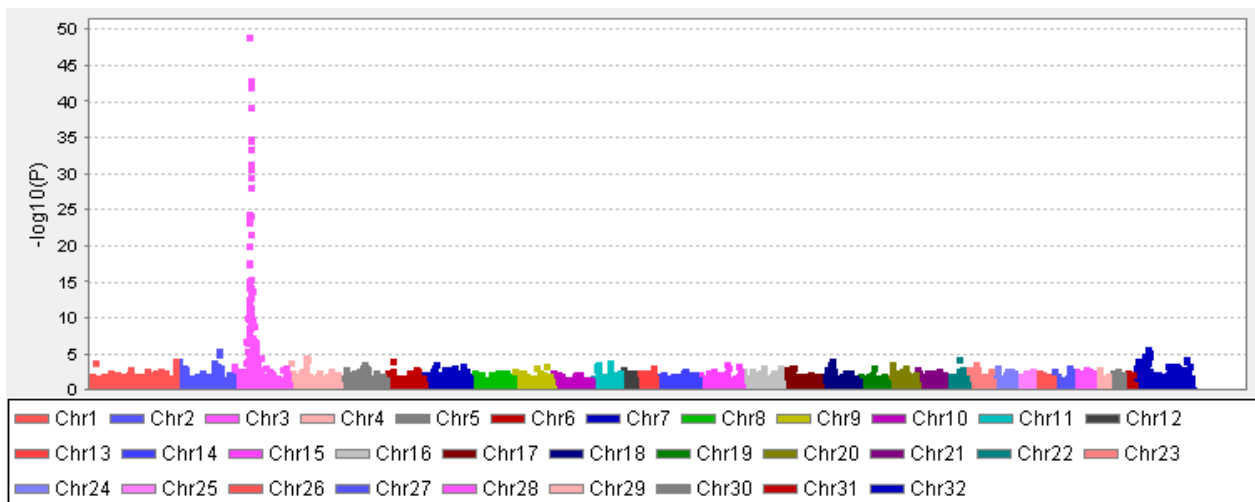


Abb. 7: Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot ohne Permutation für Fuchsfarbe (100 Fälle vs. 263 Kontrollen)

Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Abb. 8 repräsentiert die logarithmierten empirischen p-Werte nach Permutationsberechnung und zeigt dass eine hochsignifikante Assoziation mit einem EMP2-Wert von 0,001, was einem $-\log_{10}(0,001)$ von 3 entspricht, zwischen der Fellfarbe Fuchs und Chromosom 3 besteht. Das Signifikanzniveau von $> 1,3$ ist durch eine rote Linie in der Abbildung markiert. 73 SNPs wiesen in der chromosomalen Region zwischen 32 und 44 Megabasen auf Chromosom 3 eine signifikante Assoziation zur Fuchsfarbe auf.

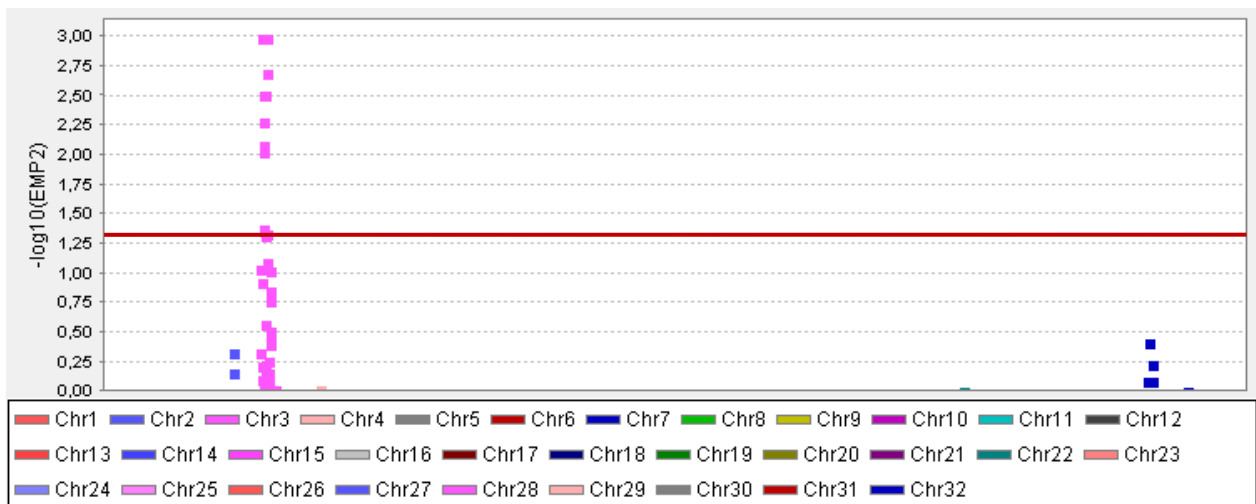


Abb. 8: Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot nach Permutation für Fuchsfarbe gegen andere Fellfarben (100 Fälle vs. 263 Kontrollen): Signifikante Assoziationen erfordern Werte $> 1,3$

4 DISKUSSION

4.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN

4.1.1 Diskussion der Einschlusskriterien

Präzise und eindeutige Kriterien zur Differenzierung von Fällen und gesunden Kontrollen sind von äußerster Wichtigkeit bei der Durchführung genetischer Studien wie der vorliegenden Arbeit (EWART und ROBINSON 2007). In die eigenen Untersuchungen wurden ausschließlich Warmblutpferde aufgenommen um eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den Individuen zu erzielen. Es ist davon auszugehen, dass eine unterschiedliche Rassenzugehörigkeit den genetischen Vergleich der Pferde allein durch deren rassespezifischen Genotyp erschwert. Beim humanen Asthma spiegeln Rassen- und Volksunterschiede in der Asthmaprävalenz die zugrunde liegenden genetischen Unterschiede wider, welche von sozialwirtschaftlichen Einflüssen und Umweltfaktoren überlagert werden (GINA 2011). In einer genetisch homologen Studienpopulation gelingt es eher, die mögliche Auswirkung einzelner DNA-Polymorphismen auf die Krankheitsentstehung aufzudecken. Eine Schichtung innerhalb der Population kann zu unechten Assoziationen führen (CARDON und BELL 2001). Dies ist der Fall wenn unterschiedliche Allelfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen auf einer verschiedenen Herkunft beruhen und eben nicht aufgrund einer Assoziation zwischen Genen und Erkrankung (SEBASTIANI et al. 2009). In vorherigen Studien wurden bereits zahlreiche Nachkommen zweier COB-kranker Schweizer Warmbluthengste durch Mikrosatelliten-Marker untersucht (JOST et al. 2007; SWINBURNE et al. 2009). Ihre Ergebnisse sprechen für eine Lokusheterogenität der für COB verantwortlichen Gene in diesen beiden Familien. Ziel der eigenen Arbeit war es, im Gegensatz zu den vorangegangenen Familienstudien, die allgemeine Warmblutpopulation in einer Fall-Kontroll-Studie zu testen. Daher wurde innerhalb der Warmblüter ein möglichst geringer Verwandtschaftsgrad der Pferde zueinander gefordert. Die Tiere sollten innerhalb der Gruppe, der sie zugeordnet wurden, also entweder den Fällen oder den Kontrollen, möglichst keine Verwandtschaft bis einschließlich der Großelterngeneration zeigen. Die Abstammung wurde anhand des Equidenpasses oder der Abstammungsurkunde kontrolliert und protokolliert. Als Fälle wurden chronisch lungenkranke Pferde mit einer COB gesucht, die Kontrollen

mussten lungengesund sein. Da die auslösenden Faktoren der COB in erster Linie organische Stäube im trockenen Heu sind (LOWELL 1990), war es bei allen Fällen für die Aufnahme in die Studie Voraussetzung, dass sie bei Ausprägung der Krankheitssymptome Zugang zu trockenem Heu hatten. Wurden die Fälle bei Einschluss in die Studie staubarm gehalten, so mussten sie davor Kontakt zu trockenem Heu gehabt haben, um den Zusammenhang der krankheitsspezifischen Symptomatik mit einer Staubexposition erkennen zu können. Zudem mussten COBler bei konsequenter Staubvermeidung eine klinische Remission oder zumindest eine Besserung der Atemwegsobstruktion aufweisen. Kontrollpferde mussten bei Studieneinschluss Kontakt mit trockenem Heu haben. Hierdurch und durch die tierärztliche klinische Untersuchung wurde gewährleistet, dass keine COB-Patienten in klinischer Remission in die Kontrollgruppe eingeordnet wurden.

Die COB tritt in konventioneller Stallhaltung vorwiegend bei fünfjährigen und älteren Pferden auf, bei steigender Prävalenz mit zunehmendem Alter (LEGUILLETTE 2003). Aus diesem Grund wurde ein Mindestalter der Fälle von sechs Jahren festgelegt. So wurde das Risiko, dass weitere Ursachen für chronische Erkrankungen des Respirationstraktes (wie z.B. bakterielle oder parasitäre Bronchitiden) verantwortlich sind, welche eher bei jüngeren Pferden auftreten, auch mit Hilfe dieser epidemiologischen Kenntnisse verringert. Ausgehend von der überwiegenden Manifestation deutlicher COB-typischer Symptome im Alter zwischen 12 und 14 Jahren (FEY 2006) wurde ein Mindestalter von 15 Jahren für die Kontrollen festgelegt. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass jüngere erwachsene Pferden mit Empfänglichkeit für eine COB, die jedoch aufgrund der zunehmend staubärmeren Haltungsbedingungen in modernen Pferdeställen noch klinisch inapparent sind, fehlerhaft als Kontrollen eingeteilt wurden. Somit diente das geforderte Mindestalter bei den Lungengesunden als zusätzliche Absicherung um den richtigen Phänotyp, nämlich Pferde ohne Neigung zur COB bei Zugang zu trockenem Heu, durch den Fragebogen möglichst eindeutig zu identifizieren. Eine obere Altersgrenze wurde für beide Gruppen nicht festgelegt, denn je älter die Kontrollen desto zuverlässiger der Ausschluss einer späten Ausprägung der COB. Andererseits steigt mit höherem Alter der Pferde die Wahrscheinlichkeit COB-krankte Fälle zu finden, da die Neigung lebenslang bestehen bleibt.

Es wurden Stuten, Wallache und Hengste in die Studie einbezogen. Nach LEGUILLETTE (2003) gibt es keine Hinweise auf eine Geschlechtsprädisposition. COUETIL und WARD zeigten 2003 in der nordamerikanischen Pferdepopulation (nach Wissen der Autorin bisher als Einzige) für Stuten ein 1,4-fach höheres Risiko im Vergleich zu männlichen Tieren an einer COB zu erkranken.

Ausschlusskriterien wurden nicht definiert. Zusätzliche akute oder chronische Erkrankungen der Pferde samt deren Therapie oder eine aktuelle Behandlung der COB spielten für die Aufnahme in die Studie keine Rolle, da diese keine Auswirkung auf den Genotyp haben.

4.1.2 Diskussion des standardisierten Fragebogens

Die sichere Erfassung eines zuvor definierten Phänotyps ist von höchster Bedeutung für die Aussagekraft von genomweiten Assoziationsstudien. Gleichzeitig sollte in die Untersuchung komplexer Erkrankungen wie der COB eine möglichst große Anzahl an Fällen und Kontrollen einbezogen werden um die Power der GWAS zu erhöhen (WEISS und SILVERMAN 2011). Um diese Anforderungen erfüllen zu können wurden alle Pferde anhand der Auswertung eines zuvor standardisierten und validierten Fragebogens mittels eines Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index (HOARSI) in Bezug auf ihren COB-Status in Fälle und Kontrollen eingeteilt. Der Fragebogen wurde 2007 von RAMSEYER et al. publiziert. Die Autoren wollten erreichen, dass allein durch detaillierte Besitzerangaben zur Lungengesundheit und zum Management der Pferde ohne aufwendige weiterführende klinische Diagnostik eine große Anzahl chronisch lungenkranker und andererseits lungengesunder Pferde zuverlässig zu erfassen war.

4.1.2.1. Validität des standardisierten Fragebogens

2010 wurde von LAUMEN et al. bestätigt, dass mit Hilfe des auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten standardisierten Fragenbogens und der HOARSI-Auswertung eine zuverlässige Unterscheidung zwischen COB-kranken Pferden und lungengesunden Kontrollen möglich ist. Dabei wurden insgesamt 71 Warmblüter

einer klinischen und einer weiterführenden Untersuchung des Atemapparates unterzogen. Es wurden davon 12 Pferde als HOARSI 3/4 in klinischer Exazerbation bewertet, 20 Pferde als HOARSI 3/4 in klinischer Remission, 17 Pferde als HOARSI 2 und 22 Pferde als Kontrollen mit HOARSI 1 eingeteilt (s. Kap. 2.3.7, S. 29-30). Kritisch ist dabei zu bewerten, dass anhand der weiterführenden Untersuchung der symptomfreien Pferde, die allein aufgrund ihrer Vorgeschichte mit HOARSI 3/4 klassifiziert wurden, ein Nachweis der COB-typischen pathologischen Veränderungen nicht möglich ist. Während einer klinischen Remission können bei COB-betroffenen Pferden Atemwegsentszündung, -obstruktion und hyperreagibilität zwar in gewissem Maß bestehen bleiben (ROBINSON 2001). Die Ergebnisse von LAUMEN et al. verdeutlichen aber, dass HOARSI 3/4 in klinischer Remission durch die klinische Untersuchung, den Neutrophilen-Gehalt in der BALF und den arteriellen Sauerstoffpartialdruck nicht von HOARSI 1 (n=22) und 2 (n=17) zu unterscheiden war. Alle 12 Pferde, die als HOARSI 3/4 in Exazerbation eingeteilt wurden zeigten die bei einer COB zu erwartenden, charakteristischen Veränderungen nach Konsensus-Kriterien (ROBINSON 2001). Somit konnte nur für etwa ein Drittel der Pferde (n=12), die als HOARSI 3/4 klassifiziert wurden und aktuell eine obstruktive Atembeschwerde aufwiesen, die Diagnose COB bestätigt werden. Bei den übrigen 20 Pferden mit HOARSI 3/4 war die Diagnose COB aufgrund des Fehlens klinischer Symptome durch offenbar erfolgreiche Therapie bzw. Optimierung des Managements anhand der Untersuchungsverfahren nicht zu sichern. Es kann festgehalten werden, dass alle vorberichtlich lungengesunden Kontrollen, die zudem auch aktuell Zugang zu trockenem Heu hatten, d.h. HOARSI 1 (n=22), bei der Überprüfung des Fragebogens mittels aufwendiger weiterführenden Untersuchungen keine Hinweise auf eine COB zeigten.

Eine weitere Untersuchung von HOTCHKISS et al. (2006) belegt ebenfalls, dass es allein durch die Auswertung spezialisierter Fragebögen wie dem Risk Screening Questionnaire (RSQ) gelingt eine COB beim Pferd mit einer Sensitivität von 83% und einer Spezifität von 85% zu diagnostizieren (s. Kap. 2.3.7, S. 29). Daraus ergibt sich, dass es anhand der Fragebogenauswertung zu einer möglicherweise falschen Einteilung von Pferden in die Fallgruppe kommen kann, wenn diese an einer chronischen Atemwegserkrankung mit anderer Ursache als einer COB leiden. Hier sind als mögliche Differentialdiagnosen beim erwachsenen Pferd akute Bronchitiden,

Lungenwurminfektionen, Veränderungen in den oberen Atemwegen (z. B: follikuläre laryngeale Hyperplasie), chronisch infektiös bedingte Entzündungen der Lunge und des Brustfells sowie Neoplasien in Betracht zu ziehen (FEY 2006). Es ist somit davon auszugehen, dass es auch in den eigenen Untersuchungen zur fehlerhaften Zuordnung von Pferden mit chronischen Atemwegserkrankungen in die Fallgruppe kam. Dieser Umstand wird dadurch relativiert, dass differentialdiagnostische Erkrankungen zur COB deutlich seltener auftreten als die COB. Desweiteren verlaufen gerade infektiös bedingte Bronchitiden und Pleuritiden wie auch Neoplasien in der Regel progressiv und sind durch äußere Bedingungen, wie z.B. Staubminimierung nicht zu beeinflussen. Der Anteil an falsch in die COB-Gruppe eingeordneten Propanden wird in der vorliegenden Arbeit auf unter zehn Prozent geschätzt. Gestützt wird diese Aussage durch die Ergebnisse von LAUMEN et al. (s.o.). Die Spezifität bezogen auf die Erfassung der Kontrollen durch den Fragebogen liegt relativ hoch, was ebenfalls durch die Arbeit von LAUMEN et al. bestätigt wurde.

4.1.2.2 Datenerhebung anhand des standardisierten Fragebogens

Um abzusichern, dass keine nicht an COB erkrankten Fälle eingeschlossen wurden erfolgte das Ausfüllen des Fragebogens in der vorliegenden Studie ausschließlich durch vier Tierärztinnen in einem 20-30minütigen persönlichen Gespräch mit den Besitzern oder Pferdehaltern vor Ort oder telefonisch. In den Gesprächen konnten Verständnisprobleme direkt gelöst werden und es konnte detailliert auf die individuelle respiratorische Symptomatik, das zeitliche Auftreten, die bisherige Diagnostik und Therapie sowie auf Haltungsänderungen eingegangen werden. Bei der Befragung wurden Suggestivfragen möglichst vermieden und die Besitzer wurden angehalten die Atemwegsproblematik selbst zu beschreiben. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Fragenden Einfluss auf die Besitzeraussagen nahmen. Um die Besitzerangaben weitestgehend vergleichbar zu machen, versucht der Fragebogen möglichst objektiv zu beurteilende Erscheinungsbilder zu erfassen. Die Ausprägung dieser Erscheinungsbilder (Husten, erschwerte Atmung in Ruhe, erschwerte Atmung bei Belastung, verlangsamte Wiederberuhigung, schlechte

Leistung, schlechte Motivation, muköser Nasenausfluss) wurde in der eigenen Arbeit jeweils mit Score-Punkten (s.u.) bewertet.

4.1.2.3 Bewertung der Besitzerangaben durch Score-Punkte

Zur semiquantitativen Bewertung der Besitzerangaben wurde in der eigenen Arbeit ein Score-Punkte-System entwickelt, wie in Kap. 3.1.1.3 detailliert beschrieben. Durch Addition der Score-Punkte ergab sich eine Bestätigung für die Einteilung der Pferde in HOARSI 1, 3 und 4 bzw. in Fälle und Kontrollen.

Husten stellt ein Symptom einer Atemwegserkrankung dar, welches leicht zu erkennen ist und die Bewertung erfordert keine fachspezifische Kenntnis oder spezielles Training der Besitzer. Einzelne Hustenstöße zu Beginn der Arbeit werden von einem Teil der Besitzer als „normales Abhusten“ akzeptiert obwohl es sich dabei, aufgrund der tierartspezifisch hohen Hustenreizschwelle des Pferdes, bereits um eine deutlich pathologische Veränderung der Atemwege handelt (HEAD und WOOD 2001). Trotz des fehlenden Bewusstseins mancher Besitzer für die Schwere des Symptoms konnte das Husten durch reine Beschreibung gut erfasst werden. In den Untersuchungen von FEY (2005) wurde bei 75% der Pferde mit chronischer Bronchitis Husten als ein Hauptsymptom festgestellt. Die Ergebnisse belegen, dass die Hustenfrequenz als wichtiger Hinweis auf die Schwere einer chronischen Atemwegserkrankung zu werten ist. Da es sich bei chronischem Husten um ein aussagekräftiges und zugleich von Besitzern gut erkennbares Symptom handelt, wurden hierfür in den eigenen Untersuchungen relativ hohe Score-Punkte vergeben. Mehrfach tägliches Husten, auch in Ruhe oder mit Hustenanfällen wurde mit fünf Score-Punkten und damit der höchsten Score-Punktzahl bewertet, während regelmäßiges aber nur einmal tägliches Husten drei Score-Punkte erhielt. Das physiologische Erscheinungsbild, keinerlei dem Besitzer auffallendes Husten, erhielt die Null.

Die klinischen Anzeichen einer COB können teils sehr subtil sein, wie eine geringgradig vermehrt abdominal betonte Ausatmung (ROBINSON 2001). Diese expiratorische Dyspnoe ist zwar ein charakteristisches Symptom der COB, wird aber weniger zuverlässig von den Besitzern wahrgenommen als Husten. Aus der

klinischen Erfahrung der Autorin heraus war für viele Besitzer eine leicht erhöhte Ruheatemfrequenz mit geringgradig vermehrt betonter Ausatmung nicht auffällig, auch wenn diese in der klinischen Untersuchung der Pferde durch versierte Personen feststellbar war. Andererseits wurden Atembeschwerden bei der Belastung von den Besitzern gut erkannt. Lediglich in knapp einem Drittel der Fälle mit chronischer Bronchitis wurden die Pferde wegen pumpender Atmung vorgestellt (FEY 2005). Im Vergleich zum Husten wurden daher für die erschwerte Atmung weniger, maximal drei Score-Punkte vergeben, zumal die Bewertung stark von subjektiven Eindrücken abhängt.

Eine verlangsamte Wiederberuhigung nach gewohnter Belastung deutet mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ein ausgeprägtes respiratorisches oder kardiologisches Problem bzw. eine Kombination aus beiden hin. Betroffene Pferde zeigen über die normale Dauer der Wiederberuhigung von maximal 15 – 20 Minuten hinaus eine deutliche erhöhte Atem- und/oder Herzfrequenz. Im Fall einer Atemwegsobstruktion kann zur Tachypnoe je nach Ausmaß der Lumeneinengung von Bronchien und Bronchioli eine abdominal betonte Ausatmung bis hin zu einer gemischten Dyspnoe mit weitgestellten Nüstern beobachtet werden. In der eigenen Arbeit wurde nur das Vorhandensein und nicht das Ausmaß einer laut Besitzerangaben verlangsamten Wiederberuhigung erfasst. Eine verlängerte Wiederberuhigung der Pferde wurde aus Sicht der Autorin von den Besitzern zuverlässig als pathologisch erkannt, wenn aus der selbstständigen Beschreibung der Besitzer hervorging, dass eine anhaltend erhöhte und/oder erschwerte Atmung für mindestens eine halbe Stunde nach Belastung vorlag. Der sichere Ausschluss einer (zusätzlichen) kardiologischen Problematik, war durch die Fragebogenerhebung nicht möglich. Zur Abklärung wäre eine tierärztliche Untersuchung, unter Umständen mit spezieller weiterführender Diagnostik inklusive Herzultraschall und Elektrokardiographie notwendig. Eine kardial bedingte verlangsamte Wiederberuhigung nach körperlicher Anstrengung kommt beim Pferd deutlich seltener vor als Atemwegsprobleme. Zudem verschlechtert sich die kardiale Problematik häufig in den nächsten Monaten (MARR 2010) und es hätten dann auch bei der klinischen Untersuchung durch die Autorin in Ruhe Symptome einer Herzinsuffizienz feststellbar sein müssen. Gleichwohl wurden für eine deutlich verlangsamte Wiederberuhigung lediglich zwei Score-Punkte vergeben, eine langsame Wiederberuhigung erhielt einen Score-Punkt.

Die Beurteilung der Leistung war dagegen einfacher, da viele Pferde mit COB während ihrer schlimmsten Krankheitsphasen aufgrund der Schwere der Atemwegsproblematik nicht belastet bzw. nur im Schritt bewegt wurden. Grund für die reduzierte Bewegung dieser Pferde war, dass bereits bei leichter Bewegung im Schritt oder sogar schon in Ruhe eine Atembeschwerde für die Besitzer offensichtlich war. Oder die Pferde wurden geschont da sie während der Bewegung starkes, teils ununterbrochenes Husten zeigten. Für eine solche deutliche Leistungsschwäche wurden zwei Score-Punkte vergeben. Waren die Pferde noch einsetzbar jedoch verbunden mit einem Leistungsmangel wurde ein Score-Punkt verteilt.

Die Beurteilung der Motivation oder Leistungsbereitschaft eines Pferdes durch die Besitzer ist schwerer zu bewerten, sowohl bei den Fällen als auch bei den Kontrollen. Trotz einer deutlichen Atemwegsproblematik gaben viele Besitzer die Motivation ihrer Pferde als genügend oder teils als gut an. Eine als schlecht beurteilte Motivation wurde gleichwohl mit maximal einem Score-Punkt bewertet. So sollte vermieden werden, dass lungengesunde Kontrollen aufgrund einer schlechten Motivation aus anderen Gründen als einer chronischen Erkrankung des Atemapparates anhand der Score-Punkte-Auswertung falsch eingeteilt wurden. Sowohl die Leistung als auch die Leistungsbereitschaft können durch zahlreiche Faktoren und anderweitige Erkrankungen als die des Atemapparates beeinflusst sein. Auch die Art der reiterlichen Nutzung, der Trainingszustand, die Anforderungen der Reiter und das Temperament bzw. der Charakter eines Pferdes spielen hier eine wichtige Rolle. Die Aussagekraft der Besitzerangaben zur Leistung und Motivation ihrer Pferde wurde in der eigenen Studie gleichwohl beibehalten, da es sich um intraindividuelle Vergleiche handelte, d.h. die Besitzer sollten Leistung und Motivation zur Zeit der schlimmsten Atemwegsproblematik vergleichend mit der Belastbarkeit und dem Leistungswillen im klinisch inapparenten bzw. im klinisch gebesserten Zustand bewerten. Da die Besitzerangaben zur Motivation eines Pferdes als wenig aussagekräftig hinsichtlich der Ausprägung einer COB zu werten sind, sollte dieses Erscheinungsbild in zukünftigen Studien nicht mehr zur Einteilung in Fälle und Kontrollen herangezogen werden.

Das Vorhandensein von mukösem Nasenausfluss wird von den Besitzern zwar gut erkannt, ist aber kein zuverlässiges Kriterium zur Abschätzung der Sekretmenge, da bekanntermaßen der überwiegende Teil des Sekretes von COB-kranken Pferden abgeschluckt wird. Zur objektiven Beurteilung einer Dyskrinie bzw. Hyperkrinie müsste bei allen Studienpferden im apparenten Stadium der COB bzw. zum Zeitpunkt der schlimmsten Symptomatik eine Endoskopie nach Belastung mit Bewertung von Sekretmenge, -Verteilung und -Viskosität sowie zytologischer Untersuchung des Tracheobronchialsekretes durchgeführt werden. Dies war im Rahmen des eigenen Studiendesigns nicht durchführbar. Es galt eine möglichst große Anzahl von Pferden mit COB in relativ kurzer Zeit zu erfassen. Aufgrund der Ergebnisse zur Validität des Fragebogens (LAUMEN et al. 2010) konnte davon ausgegangen werden, dass dieses Ziel auch unter Verzicht auf weiterführende klinische und labormedizinische Diagnostik erreichbar ist. Nur ein sehr kleiner Anteil der Probanden zeigte zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme und Befragung eine schwerwiegende Atemwegsproblematik. Beim Großteil der Pferde lag die schlimmste klinische Symptomatik ihrer COB Monate, teils auch Jahre zurück. Das Vorhandensein von mukösem Nasenausfluss wurde wegen seiner relativ geringen Aussagekraft nur mit einem Score-Punkt bewertet.

Da bei einer COB die klinische Symptomatik stark von den Umweltbedingungen abhängt und dabei zwischen klinisch inapparent bei optimalem, staubarmem Management über eine gering- bis mittelgradige Atemwegsproblematik bis hin zur hochgradigen Atemnot bei massiver Staubbelastung variieren kann (LEGUILLETTE 2003), basierte die Bewertung der Fälle immer auf dem Zeitraum der von den Besitzern angegebenen schlimmsten chronisch respiratorischen Symptomatik. Chronisch bedeutet, dass die Symptome mindestens sechs Wochen angehalten haben mussten, bevor die Fälle in die Studie einbezogen wurden. Besteht der Verdacht, dass sich initial ein Infekt ereignet hat, sollte die Ausschlussdiagnose COB erst gestellt werden, wenn die Symptomatik länger als drei Monate besteht (FEY 2006). Daher wurde für alle Pferde, die als COB-krank in die Studie einbezogen wurden, eine Dauer der Atemwegsproblematik von mindestens zwei Monaten gefordert. Im Gegenzug durften lungengesunde Kontrollen nie länger als zwei Wochen eine respiratorische Symptomatik aufweisen. Hierdurch sollte eingeräumt werden, dass Pferde die einmalig an einer akuten Bronchitis erkrankt waren, seither

aber keine Atemwegsproblematik mehr aufwiesen, als Kontrollen in die Studie einbezogen werden konnten. Akute Bronchitiden sind von der COB abzugrenzen und werden bei erwachsenen Warmblütern meist durch Virusinfektionen, insbesondere durch das equine Herpesvirus (EHV)-1 und EHV-4, das Virus der equinen Virus Arteritis (EVA) sowie durch Reo- und Rhinoviren ausgelöst. Bakterielle Sekundärinfektionen sind möglich. Bei adulten Tieren mit intaktem Immunstatus werden die Infektionserreger eliminiert und führen nicht zu einer persistierenden Infektion (THEIN 2006).

Es erwies sich als deutlich schwieriger die lungengesunden Kontrollen sicher zu identifizieren als Pferde mit COB zu finden. So stellte sich im Laufe einiger Befragungen heraus, dass ein von den Besitzern als lungengesund bezeichnetes Pferd regelmäßig zu Beginn der Arbeit „abhustet“ oder v.a. im Winterhalbjahr ab und zu hustet. Diese Pferde wurden nicht in die Studie einbezogen.

4.1.2.4 HOARSI

Die per Fragebogen gesammelten Informationen wurden in der eigenen Arbeit anhand von Score-Punkten ausgewertet und jedes Pferd konnte anhand der Score-Punkt-Summe in eine der drei Kategorien HOARSI 1, 3 oder 4 eingeteilt werden. Dadurch wurde versucht die Unterschiede zwischen den Gruppen zu verifizieren und Unterschiede zwischen Individuen semiquantitativ differenzierbarer zu machen (s. Kap. 3.1.1.3., S. 39-42. Dies diente als interne Kontrolle, ob der per Score-System ermittelte Schweregrad der Symptomatik mit der HOARSI-Einteilung übereinstimmt. Die „klassische“ Einteilung in HOARSI 1-4 in den vorherigen Studien (RAMSEYER et al. 2007; JOST et al. 2007; SWINBURNE et al. 2009; LAUMEN et al. 2010) beruhte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ausschließlich auf Rangzahlen (s. Kap. 3.1.1.2, S 37-39).

HOARSI 2 wurde nicht in die eigene Studie aufgenommen. HOARSI 2 bezeichnet Pferde mit einer milden chronischen Atemwegsproblematik wie ab und zu Husten (intermittierend, auch hustenfreie Phasen) oder muköser Nasenausfluss ohne jegliche erkennbare Atemwegsobstruktion. Diese Symptome sind jedoch zu unspezifisch und erfordern weiterführende Untersuchungen zur genauen Abklärung.

Differentialdiagnostisch kommen für eine milde, nicht infektiös bedingte respiratorische Symptomatik vor allem Veränderungen in den oberen Atemwegen oder eine Inflammatory Airway Disease (IAD) in Betracht, deren Diagnose eine endoskopische Abklärung und bei der IAD zusätzlich eine zytologische Untersuchung von TBS bzw. BALF notwendig machen (COUETIL et al. 2007).

Als kritisch ist die Aufnahme von Pferden mit „nur“ regelmäßigem (einmal täglich) Husten als dominierendem Erscheinungsbild ohne offensichtliche Atemwegsobstruktion zu werten. Das trifft in der eigenen Arbeit auf neun von 186 bzw. 4,8% der Fälle zu. Diese Pferde erhielten jeweils drei Score-Punkte für regelmäßiges Husten und einen Punkt für mukösen Nasenausfluss und wurden so mit insgesamt vier Score-Punkten in HOARSI 3 eingeteilt. Die Atemwegsobstruktion ist bereits in der Bezeichnung des Krankheitsbildes als chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis verankert. Sie spiegelt klinisch die der COB zugrunde liegenden Pathomechanismen, wie Bronchokonstriktion, entzündliche Schleimhautschwellung und Ansammlung eines übermäßig viskösen Sekretes in den kleinen Atemwegen, wider (DEEGEN 1992). Bekannt ist jedoch auch, dass die Atembeschwerden bei einer COB in sehr unterschiedlichem Grad ausgeprägt sind und dass regelmäßiger Husten vor allem bei stark betroffenen Pferden auftritt. Eine Atemwegsobstruktion kann zunächst durch die verstärkte Durchblutung noch gut ventilierter Alveolarflächen kompensiert werden, so dass zwar ein Leistungsmangel auftritt, aber keine auffälligen Symptome in Ruhe (ROBINSON 2001). Husten ist ein polysynaptischer Schutzreflex zur Reinigung der Atemwege von eingedrungenen Schmutzpartikeln und Fremdkörpern, ausgelöst durch Reizung von Rezeptoren in der tracheobronchialen Schleimhaut (PSCHYREMBEL 1998). Bei vermehrter Schleimansammlung in den Atemwegen wie bei der COB, soll das Husten zum Abtransport des Sekrets beitragen. Fraglich bleibt, ob die neun Pferde, die laut Besitzerangaben zwar regelmäßig husten aber keine weiteren Symptome zeigen zu Recht in HOARSI 3 eingeteilt wurden. Solche Pferde könnten eher unter einer IAD als unter einer COB leiden. Auch die Tatsache, dass sich der Husten dieser Pferde durch staubarme Haltung verbesserte macht eine Diagnosefindung nicht einfacher, da dies sowohl für die IAD als auch für die COB zutrifft (COUETIL et al. 2007). Die neun Pferde mit Einteilung in HOARSI 3 aufgrund von regelmäßigem Husten und Nasenausfluss stellen sicher Grenzfälle dar, die eigentlich eine weiterführende

Diagnostik zur sicheren Abklärung erfordert hätten. Um die Zuverlässigkeit der exakten Phänotypisierung COB-kranker Pferde anhand von Besitzerangaben weiter abzusichern sollten in zukünftige Studien Pferde, die „nur“ regelmäßigen Husten (einmal täglich) und mukösen Nasenausfluss als einzige für den Besitzer erfassbare Symptome einer chronischen Atemwegserkrankung aufweisen, nicht als Fälle einbezogen werden. Auf diese Weise kann eine fehlerhafte Kategorisierung von Pferden, die eventuell unter einer IAD - aber nicht unter einer COB - leiden ausgeschlossen werden. Ausschließlich Pferde, die zusätzlich zu regelmäßigem Husten auch eine für den Besitzer offensichtliche Atemwegsobstruktion zeigen sollten als Fälle aufgenommen werden. Bei Verwendung des durch die Autorin entwickelten Score-Systems sollte eine Mindestpunktzahl von sechs in den atemwegsspezifischen Erscheinungsbildern für die Fälle gefordert werden. So würden ausschließlich Pferde die zusätzlich zu regelmäßigem Husten und Nasenausfluss eine erschwerte Atmung in Ruhe oder bei Belastung aufweisen als Fälle eingeteilt.

4.1.3 Diskussion der klinischen Untersuchung

Es wurde bei allen Pferden vor der Blutprobenentnahme eine allgemeine klinische Untersuchung durchgeführt. Diese diente u.a. der Besitzermotivation. Beide Venae jugulares wurden speziell auf Anstaubarkeit, Blutabfluss, Schmerzhaftigkeit und Schwellungen hinsichtlich einer akuten Venenentzündung oder einer Venenthrombose untersucht. Desweiteren wurde eine spezielle Untersuchung des Atemtraktes in Ruhe vorgenommen. Die lungengesunden Kontrollen durften dabei keinerlei Anzeichen einer Atemwegsobstruktion aufweisen. So war es anhand der klinischen Untersuchung der Kontrollen möglich die Besitzerangaben zu überprüfen und insbesondere die korrekte Zuordnung der Pferde in die Kontrollgruppe abzusichern. Nach Kenntnis der Autorin deckten sich, zumindest bei den in Deutschland gesammelten Proben, die Besitzerangaben vollständig mit dem Befunden der speziellen Untersuchung des Atemtraktes in Ruhe und es kam nicht zu einem Ausschluss von Kontrollpferden aus der Studie durch klinische Hinweise auf eine Atemwegsobstruktion.

Die Einteilung der Pferde in COB-krank basierte ausschließlich auf den Angaben der Besitzer zum Zeitpunkt der schlimmsten Atemwegsproblematik und war unabhängig von den Befunden der speziellen Untersuchung des Respirationstraktes der Pferde zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die individuelle Ausprägung der COB-typischen Symptome schwankt stark zwischen nicht feststellbar über eine geringgradige Symptomatik bis hin zur hochgradigen gemischten Dyspnoe, je nach Staubexposition und Haltungsbedingungen (ROBINSON 2001). Von den 66 in Deutschland untersuchten Fällen zeigten nur sechs Pferde (9%) bei Blutprobenentnahme eine hochgradige Ausprägung der COB und standen diesbezüglich unter Therapie. Die klinische Untersuchung der Fälle diente auch dazu, ausgeprägte kardiologische Probleme mit Anzeichen einer Herzinsuffizienz als Ursache für einen Leistungsmangel oder eine Tachypnoe auszuschließen.

Das Ziel der Studie lag in der Identifizierung von Genloci die für die equine COB (mit) verantwortlich sind. Da der Genotyp, d.h. die Gesamtheit aller Gene unabhängig vom aktuellen Gesundheitszustand eines Individuums ist, war es bei Blutentnahme ohne Bedeutung, ob bzw. in welcher Ausprägung klinische Anzeichen einer COB vorlagen. Desweiteren hatte es keine Konsequenzen für die eigene Studie, ob die Pferde unter einer aktuellen Behandlung der COB standen oder an anderen akuten oder chronischen Erkrankungen litten.

4.1.4 Diskussion der SNP-Chip-Untersuchung

Die SNP-Chip-Technologie ermöglicht es hunderttausende genetische Marker simultan zu genotypisieren (ILES 2008). 2008 waren bereits über zehn Millionen SNPs für das menschliche Genom bekannt, wobei von den meisten keine funktionellen Effekte erwartet werden (SENG und SENG 2008). Je höher die Anzahl an genomweit verteilten genetischen Markern auf dem Chip, desto größer ist die Chance alle chromosomalen Regionen möglichst zuverlässig zu testen. Inzwischen können beim Menschen bis zu 4,3 Millionen SNPs mittels des HumanOmni5-Quad BeadChips gleichzeitig genotypisiert werden (Angaben laut Hersteller: Illumina®, San Diego, USA, s. Kap. 2.4, S. 31). Die SNPs werden so ausgewählt, dass sie ein möglichst hohes „coverage“ erzielen. Das heißt, dass ein möglichst hoher Anteil von in der jeweils untersuchten Population häufigen SNPs durch den Chip abgedeckt

werden (DEPNER 2009). Andererseits bedeutet dies, dass seltene Varianten nicht durch den Chip erfasst werden.

Der erste kommerzielle SNP-Chip für das Pferd wurde 2008 von Illumina® (San Diego, USA) in Zusammenarbeit mit dem International Equine Genome Mapping Workshop und dem Morris Animal Foundation's Equine Genome Consortium entwickelt (s. Kap. 2.4.5, S. 35). Im Vergleich zur massiven Steigerung der Markerdichte innerhalb der letzten Jahre in der Humanmedizin ist die Markerdichte des auch in der vorliegenden Untersuchung verwendeten EquineSNP50 Genotyping BeadChips (Illumina®, San Diego, USA) inzwischen als niedrig zu bewerten. Ein neuer kommerziell zu erwerbender SNP-Chip für das Pferd, welcher etwa 74.000 SNPs gleichzeitig genotypisiert, befindet sich in der Entwicklung. Es bleibt zu hoffen, dass in den nächsten Jahren SNP-Chips mit einer noch höheren, der Humanmedizin vergleichbaren Markerdichte für das Pferd zur Verfügung stehen. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass ein viel größeres globales Interesse und ganz andere finanzielle Mittel hinter der Entwicklung von SNP-Chips zur Aufklärung von schwerwiegenden humanen Erkrankungen wie z.B. dem Asthma, der COPD, dem Diabetes mellitus oder dem Morbus Crohn stehen. Aktuell fallen für die Genotypisierung einer Probe mittels EquineSNP50 Genotyping BeadChips Kosten von 150-200\$ an.

Nach Wissen der Autorin wurde der EquineSNP50 Genotyping BeadChip erstmals 2010 von BROOKS et al. erfolgreich zur Identifizierung einer Krankheitsdisposition beim Pferd eingesetzt: mit Hilfe eines Gesamtgenomscans wurde eine Mutation im Myosin Va (MYO5A)-Gen nachgewiesen, welche zum letalen Lavender Foal Syndrom (LFS) bei ägyptischen Araberpferden führt (s. Kap. 4.2.3, S 89-90).

In der eigenen Arbeit wurden alle 364 Warmblutpferde mittels EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) am Animal Health Trust in Newmarket genotypisiert. Methodische Probleme bei der Anwendung und Auslesung des Chips traten nach Kenntnis der Autorin nicht auf.

4.1.5 Diskussion der Methodik der multidimensionalen Skalierungen

Multidimensionale Skalierungen (MDS) bieten die Möglichkeit die genetische Variabilität innerhalb einer Population quantitativ zu bestimmen und anhand einer

Punktwolke als sog. MDS-Plot zu veranschaulichen. Im Rahmen von GWAS wird diese Methode standardmäßig zur Überprüfung der Homogenität von Populationen eingesetzt (PURCELL et al. 2007). In der eigenen Arbeit wurden multidimensionale Skalierungen zur Überprüfung und Verifizierung der genetischen Ähnlichkeit der Pferde untereinander durchgeführt. Dazu wurde die PLINK Software v1.07 (PURCELL et al. 2007) verwendet. Das Ziel dieser Auswertungen war es zu prüfen, ob die in die eigenen Untersuchungen einbezogenen, nicht direkt verwandten Individuen aus einer möglichst genetisch homogenen Warmblutpopulation kamen. Die Berechnungen dienten somit vorrangig der eigenen Kontrolle. Bekannterweise kann in einer heterogenen Population das Ergebnis von genomweiten Assoziationsstudien verzerrt werden bzw. sie kann auch zu falschen Assoziationen führen (DEPNER 2009). Um eine relativ hohe genetische Ähnlichkeit zu erreichen wurden ausschließlich Warmblutpferde in die Studie eingeschlossen. Desweiteren war von Interesse ob sich bereits offensichtliche genetische Unterschiede zwischen den Fällen und den Kontrollen abzeichnen, wenn man die übliche zweidimensionale Darstellung wählt. Nach Aussage von Prof. Dr. Tosso Leeb vom genetischen Institut der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern war diese zweidimensionale Darstellung der Genotypinformationen der 364 Warmblüter als MDS-Plot ausreichend zur Interpretation der genetischen Ähnlichkeit innerhalb der Studienpopulation. Es wurde zudem ein möglicher Einfluss des Zuchtlandes auf genetische Unterschiede zwischen den Warmblütern überprüft.

4.1.6 Diskussion der Methodik der genomweiten Assoziationsstudien

Das Ziel von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) ist die Identifizierung eines verursachenden Gen-Locus z.B. in Bezug auf die Ausprägung einer Erkrankung. Im Idealfall zeigt sich eine hohe Assoziation der krankheitsassoziierten genetischen Marker zum untersuchten Phänotyp (DEPNER 2009). Im nächsten Schritt können dann Gene aus dieser chromosomalen Region auf einen möglichen pathogenetischen Zusammenhang mit der Krankheit überprüft werden. Hierfür werden sogenannte Kandidatengenanalysen eingesetzt.

Der konkrete Ansatz der eigenen Studie war es, mit der COB assoziierte SNPs zu identifizieren. Dazu wurden 54.602 genomeit verteilte SNPs durch GWAS in einem

Fall-Kontroll-Design überprüft. Für jeden SNP wurde berechnet wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine Assoziation in der Fallgruppe im Vergleich zu den Kontrollen vorliegt. Außer dem Vergleich der Fälle d.h. von Pferden mit COB gegen lungengesunde Kontrollen, wurden gezielt Phänotypassoziationen für spezifische Erscheinungsbilder der COB getestet. Dahinter steht die Überlegung, dass unterschiedliche Symptome wie z.B. Husten oder angestrengte Atmung mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen assoziiert sein können. Die drei Pathomechanismen der equinen COB, Bronchospasmus, Dyskrie und Schleimhautschwellung laufen beim einzelnen Patienten meist zwar gleichzeitig, jedoch in unterschiedlichem Grad ab. Unklar ist bisher ob es sich bei der Ausschlussdiagnose COB um eine Zusammenfassung ätiologisch und pathogenetisch unterschiedlicher Erkrankungen handelt (FEY 2006). Ein Gesamtgenomscan stellt eine gute Möglichkeit dar, Unterschiede in der Pathogenese chronischer Atemwegsobstruktionen aufzudecken. Es wurde versucht feinere Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen den COB-kranken Pferden zu finden, indem die individuellen Ausprägungen spezifischer Symptome der COB als sog. Phänotypen einzeln bewertet und getestet wurden. Wie in vorhergehenden Familienstudien erfolgte die Berechnung der Phänotypassoziationen für folgende sieben Erscheinungsbilder: Husten, erschwerte Atmung in Ruhe, erschwerte Atmung bei Belastung, verlangsamte Wiederberuhigung, schlechte Leistung, schlechte Motivation, muköser Nasenausfluss. So war es möglich z.B. nur Pferde die eine deutlich erschwerte Ausatmung in Ruhe oder in Belastung, als Zeichen einer starken Einengung der kleinen Atemwege zeigten als Fälle zu werten. Dadurch wurde versucht noch gezielter die zentralen Pathomechanismen, die der Atemwegsobstruktion zugrunde liegen, zu untersuchen.

Zur internen Kontrolle der Methodik wurde in der eigenen Warmblutpopulation eine Assoziationsberechnung zur Fellfarbe Fuchs durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Kap. 4.2.3, S. 89 diskutiert.

4.1.7 Diskussion zur Berechnung der Power von genetischen Untersuchungen

Das Ziel genomweiter Assoziationsstudien besteht darin, Zusammenhänge zwischen einer Krankheit und einer genetischen Variation zu finden. Die Power oder Teststärke

gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein vorhandener Effekt auch wirklich aufgedeckt werden kann. Eine ungenügende Power eines statistischen Tests kann z.B. durch eine zu kleine Stichprobe bedingt sein (DEPNER 2009). Eine Powerberechnung sollte daher vor Beginn einer jeder Studie durchgeführt werden um den notwendigen Stichprobenumfang abschätzen zu können.

Die Schwierigkeit der Powerberechnung besonders bei genetischen Untersuchungen ist, dass zahlreiche Einflussgrößen berücksichtigt werden müssen, die im Vorfeld nicht bekannt sind und höchstens geschätzt werden können. Zu diesen Einflussfaktoren gehört zum einen die Allelfrequenz bzw. die Minorallelfrequenz (MAF). Die Allelfrequenz bezeichnet die Häufigkeit, mit der ein Allel in einer Population an einem gegebenen Genlocus vertreten ist. Die Häufigkeit aller Allele an einem Genlocus beträgt 100% (PASSARGE 2008b). Alle getesteten SNPs haben genau zwei Allele. Die Minorallelfrequenz bezieht sich auf die Häufigkeit mit welcher das seltenere der beiden Allele in einer Population auftritt (NICHOLAS 2010c). Effekte, die durch häufige Allele ausgelöst werden haben eine höhere Wahrscheinlichkeit detektiert zu werden. Es ist anzunehmen, dass Geneffekte seltener Allele sogar mit den 2008 in der Humanmedizin üblichen Studiengrößen von bis zu 3.000 Menschen selbst dann übersehen werden können, wenn es sich um für die Ausprägung des Phänotyps kausalen Gen-Loci handelt (ILES 2008). Weitere Einflussgrößen bei der Powerberechnung sind das Kopplungsungleichgewicht und die QTL-Frequenz. Das Kopplungsungleichgewicht oder Linkage Disequilibrium (LD) beschreibt, dass eine bestimmte Kombination von Allelen gekoppelter Loci bevorzugt auftritt, z.B. kann ein Krankheitslocus bevorzugt mit einem bestimmten Allel bzw. einem Marker gekoppelt sein (PASSARGE 2008b). Die Power von GWAS ist direkt proportional zum Grad des LD zwischen einer verursachenden Variante und SNP-Markern (DUPUIS et al. 2011). Genloci, die zu einem quantitativ fassbaren Merkmal beitragen (engl. Trait, ein beobachtbarer Teil eines Phänotyps) werden als Quantitative Trait Locus (QTL) bezeichnet (PASSARGE 2008b). Auswirkung auf die Power haben zudem die Effektstärke des Allels, additive Geneffekte und Gen-Umwelt-Interaktionen. Weiter ist zu berücksichtigen, dass eine kausale Variante nur aufgedeckt werden kann, wenn sie frequent genug ist, um mittelbar per SNP auf dem Chip detektierbar zu sein (DEPNER 2009).

In der eigenen Studie wurden durch einen Gesamtgenomscan genomweit verteilte SNPs auf Assoziation zur COB hin getestet, um die für die Krankheitsprädisposition verantwortlichen Genloci zu finden. Zu Beginn der Untersuchungen gab es also keine Aussage über möglicherweise mit der equinen COB assoziierte Gene, wodurch wiederum keine Angaben zu den Einflussgrößen bei der Powerberechnung gemacht werden konnten. Aus diesem Grund wurde in der eigenen Studie auf eine prospektive Berechnung der Power verzichtet, da diese nur auf Grundlage grob geschätzter Größen hätte berechnet werden können. Je nachdem wie optimistisch die Annahmen für die unbekannten genetischen Varianten bei einer Mindestpower von 80% gewählt werden, entsprechend gering oder entsprechend hoch fällt die Anzahl an erforderlichen Stichproben aus, um einen genetischen Effekt aufdecken zu können (ILES 2008; SEBASTIANI et al. 2009).

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.2.1 Diskussion der Patientendaten

Die Studie wurde in Kooperation mit der Pferdeklinik und dem Institut für Genetik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern sowie der Klinik für Pferde, Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie dem Department für Genetik des Animal Health Trust in Newmarket durchgeführt. In einem Zeitraum von zwei Jahren zwischen Dezember 2007 und Dezember 2009 wurden Proben in der Schweiz und in Deutschland gesammelt. Drei Tierärztinnen entnahmen Blutproben von Pferden in der gesamten Schweiz, die deutschen Proben wurden von der Autorin überwiegend in Hessen gesammelt. Entsprechend liegt die Anzahl der Schweizer Proben bei insgesamt 248 (davon 120 Fälle und 128 Kontrollen), die der deutschen Proben bei 116 (davon 66 Fälle und 50 Kontrollen).

Durch die Auswertung des selbst entwickelten Score-Systems gelang es, jedes Individuum anhand der Summe seiner Score-Punkte auf die korrekte Zuordnung zu einer der Gruppen HOARSI 1 (0-2 Punkte), 3 (4-7 Punkte) oder 4 (8-16 Punkte) zu überprüfen (s. Kap. 3.1.1.3, S 39-42). Das angewandte Score-System ist geeignet, um die vier HOARSI-Kategorien in eine semiquantitativ besser differenzierbare Systematik zu überführen. 80% der Fälle wurden mit HOARSI 4 kategorisiert, die restlichen 20% mit HOARSI 3. Somit zeigten über drei Viertel der Fälle eine hochgradige COB und knapp ein Drittel eine mittelgradige COB. Je stärker die Ausprägung der chronischen Atemwegserkrankung und je besser diese Symptome von den Besitzern und Pferdebetreuern zu erkennen sind, desto zuverlässiger ist die eindeutige Identifizierung des gesuchten Phänotyps, nämlich von Pferden mit COB mittels des HOARSI-Fragebogens (LAUMEN et al. 2010).

Da bei der polygenetisch verankerten COB davon ausgegangen wurde, dass auch in der Kontrollgruppe eine relativ hohe Variabilität vorhanden ist, wurde ein Verhältnis der Fälle zu den Kontrollen von 1:1 gewählt, trotz der dann insgesamt hohen Anzahl an Proben. Die Probandenanzahl der eigenen Studie von insgesamt 364 Warmblütern liegt deutlich unter der Anzahl an Individuen, wie sie in vergleichbaren humanen Fall-Kontroll-Studien zur Berechnung genomweiter Assoziationen eingesetzt werden. In die erste GWAS, durch die 2007 eine Assoziation zum humanen Asthma aufgedeckt werden konnte, wurden knapp 1.000 Asthmatiker und

etwas über 1.000 Kontrollen einbezogen (MOFFATT et al. 2007). Seit 2010 werden in GWAS für das humane Asthma und die COPD in sogenannten Meta-Analysen, also durch die Auswertung mehrerer methodisch vergleichbarer Studien, bis zu 50.000 Probanden getestet (ARTIGAS et al. 2011; BARNES 2011). Eine hohe Probandenzahl erhöht deutlich die Power genetischer Studien zur Untersuchung komplexer polygenetischer Erkrankungen (ARTIGAS et al. 2011) wie z.B. der equinen COB, des humanen Asthmas oder der COPD. Im Gegensatz zur Humanmedizin fällt es in der Tiermedizin noch erheblich schwerer große Probandenzahlen eines gesuchten Phänotyps zuverlässig zu rekrutieren, da es keine zentralen Informationsspeicher zu Krankendaten und Diagnosen von Tieren gibt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Umfang an geeigneten Probanden durch die Kooperation der Berner und Gießener Pferdeklinik deutlich erhöht. Der standardisierte Fragebogen bot hierbei die Möglichkeit eine recht hohe Zahl von 364 Warmblütern, die den beiden definierten Phänotypen entsprachen, in einer relativ kurzen Zeit von zwei Jahren sicher zu erfassen, was mittels klinischer und weiterführender Untersuchung aller Probanden viele Jahre in Anspruch nehmen würde. Dadurch dass ausschließlich Warmblutpferde einbezogen wurden, sollte die genetische Variabilität auf diese eine Rasse eingeschränkt werden, um so die Wahrscheinlichkeit, bei einigen hundert Probanden krankheitsassoziierte Genloci identifizieren zu können zu stärken. Andererseits waren viele COB-krankte Pferde somit alleine aufgrund ihrer Rassezugehörigkeit nicht für die Studie geeignet. Die Auswahl innerhalb der Warmblüter wurde wiederum durch die Forderung nach einem möglichst niedrigen Verwandtschaftsgrad untereinander eingeschränkt. Hinzu kommt der finanzielle Aspekt, da aufgrund der (noch) relativ hohen Kosten von 150-200 US\$ für die Genotypisierung einer Probe mittels Equine SNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) der Untersuchungsumfang von den vorhandenen Forschungsgeldern abhängig ist. Gleichwohl wurde mit dieser im Vergleich zu heutigen humanmedizinischen Studien relativ niedrigen Probandenzahl begonnen, da bei Studienbeginn im Jahr 2007 noch keine Erfahrungen und Daten zur Untersuchung polygenetisch bedingten Erkrankungen mittels SNP-Chip beim Pferd vorlagen. So stellt das Dissertationsprojekt den ersten Gesamtgenomscan zur COB bei nicht verwandten Warmblutpferden durch Einsatz des Equine SNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) dar und schafft die Grundlage für Folgearbeiten zur Aufdeckung der COB-Pathogenese anhand von SNP-Chip-

Untersuchungen. Bis heute gibt es nach Kenntnis der Autorin noch keine sicheren Angaben über den erforderlichen Probenumfang, um krankheitsrelevante Genvarianten bei komplexen Krankheiten des Pferdes durch Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit zu identifizieren.

Der Altersmittelwert der Fälle von $15,8 \pm 4,6$ Jahren bei einer Spanne von sieben bis 31 Jahren deckt sich sehr gut mit den Altersangaben aus der Literatur für COBler. AINSWORTH gibt an, dass die RAO bei siebenjährigen und älteren Pferden auftritt (AINSWORTH 2010). Nach LEGUILLETTE sind hauptsächlich erwachsene Pferde, die älter als fünf Jahre sind, betroffen bei steigender Prävalenz mit zunehmendem Alter (LEGUILLETTE 2003). Dieser Annahme widersprechen die Untersuchungen von FEY, die bei ihren Patienten mit chronischer Bronchitis eine annähernd normalverteilte Darstellung der Altersdaten zeigte. Hier lag das Alter im Mittel bei 11,8 Jahren bei einer Spanne von drei bis 24 Jahren (FEY 2005). Für die eigenen Untersuchungen wurden gezielt Pferde mit einer möglichst mehrjährigen Krankengeschichte gesucht. Bei der überwiegenden Anzahl der Probanden war eine COB bereits im Vorfeld tierärztlich diagnostiziert worden und über 90% wiesen durch eine Optimierung der Haltung bereits eine deutliche Besserung der chronischen Atemwegsproblematik auf oder waren klinisch inapparent. Wahrscheinlich aus diesem Grund lag der Altersmittelwert von $15,8 \pm 4,6$ Jahren hier etwas höher im Vergleich zur vorher genannten Studie, in welche Patienten einbezogen wurden, die zur Abklärung von chronischem Husten und Leistungsmangel in der Klinik untersucht wurden. Der Anteil der chronisch lungenkranken Pferde unter zehn Jahren lag in der eigenen Studie bei 5,9% (11/186), wobei die beiden jüngsten Pferde siebenjährig waren und mit HOARSI 4 kategorisiert wurden. Dagegen waren 41,4% (77/186) der Fälle jünger als 15 Jahre und 35,5% (66/186) lagen zwischen zehn und 15 Jahren, was für eine Häufung von deutlich ausgeprägten respiratorischen Symptomen bei empfänglichen Individuen bereits im mittleren Alter entspricht. Bei den Kontrollen ergab sich wie zu erwarten ein höherer Alterswert als bei den Fällen mit einer Spannweite von 15 bis 29 Jahren, da ein Mindestalter von 15 Jahren für alle Kontrollpferde gefordert wurde (s. Kap. 4.1.1, S. 65-67).

Die Geschlechtsverteilung war in der Fallgruppe annähernd gleich wie in der Kontrollgruppe (s. Kap. 3.3.1, S. 52) und spiegelt mit einem überwiegend Anteil an

Wallachen die allgemeine Verteilung in der zur freizeitlichen oder sportlichen Nutzung gehaltenen Warmblutpopulation wider.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der multidimensionalen Skalierungen

Die Ergebnisse der multidimensionalen Skalierungen bestätigen eine hohe genetische Ähnlichkeit innerhalb der eigenen Studienpopulation. Gewisse geringe genetische Unterschiede zwischen den Zuchtländern sind eventuell durch einen sogenannten Gründereffekt zu erklären. Der Gründereffekt (Founder effect) beschreibt die genetische Abweichung einer isolierten Population von der Stammpopulation. Die Allelhäufigkeit wird durch diejenige der Gründer bestimmt (NICHOLAS 2010c). In der Warmblutpferdezucht werden nur ausgewählte, gekörte Hengste zur Zucht zugelassen, was über die Zeit zu einer relativen Einschränkung der genetischen Vielfalt im jeweiligen Zuchtverband führen kann.

Es wurde versucht diese allerdings sehr feinen genetischen Unterschiede zwischen den Warmblütern zu berücksichtigen, indem zusätzlich Rassengruppen für die Berechnung der GWAS gebildet wurden. Durch diese Aufteilung ergab sich zwangsläufig eine Reduktion der Probandenzahl pro Rassengruppe, was wiederum die Power der Berechnungen erniedrigt. Die deutschen Warmblüter stellten die größte Rassengruppe mit 140 Probanden dar gefolgt von den Pferden des Zuchtverbandes des Schweizer Warmblut-Sportpferdes (ZVCH) mit 108 Warmblütern. Die Schweizer Warmblüter zeigten, wie im MDS-Plot auf S. 88 dargestellt, eine auffällig hohe genetische Ähnlichkeit mit den Selle Francais (n=31), weshalb diese beiden Rassengruppen zu einer zusammengefasst wurden um die Gruppengröße für die GWAS zu erhöhen.

In einer vergleichbaren Untersuchung zur Stratifikation der Population (s. Abb. 9, S. 88) wird die offensichtliche genetische Separation von Golden Retrievern je nach ihrer Herkunft aus den USA oder Dänemark gezeigt (KARLSSON et al. 2007). Auch wenn die Darstellungen der genetischen Verteilung in Abb. 9 und Abb. 10 mittels unterschiedlicher Software (Eigensoft/PLINK) erstellt wurden lässt sich erkennen, dass in der eigenen Untersuchung die Distanzen auf der x- und y-Achse deutlich kleiner sind. Die hohe Überlagerung der Pferde im Koordinatenkreuz in Abb. 10

Diskussion – Ergebnisse

zwischen -0,09 bis 0,07 auf der x-Achse und -0,06 bis 0,06 auf der y-Achse verdeutlicht, dass es sich bei der eigenen Warmblutpopulation im Gegensatz zur Golden Retriever-Population um eine genetisch sehr homogene Gruppe handelt. Daher ist es bei der Durchführung von GWAS in der eigenen Warmblutpopulation effizienter auf eine zusätzliche Unterteilung der Pferde in Rassengruppen zu verzichten, um die Probandenanzahl und somit auch die Power der Assoziationsberechnungen nicht unnötig zu vermindern.

<http://genepath.med.harvard.edu/~reich/Software.htm>

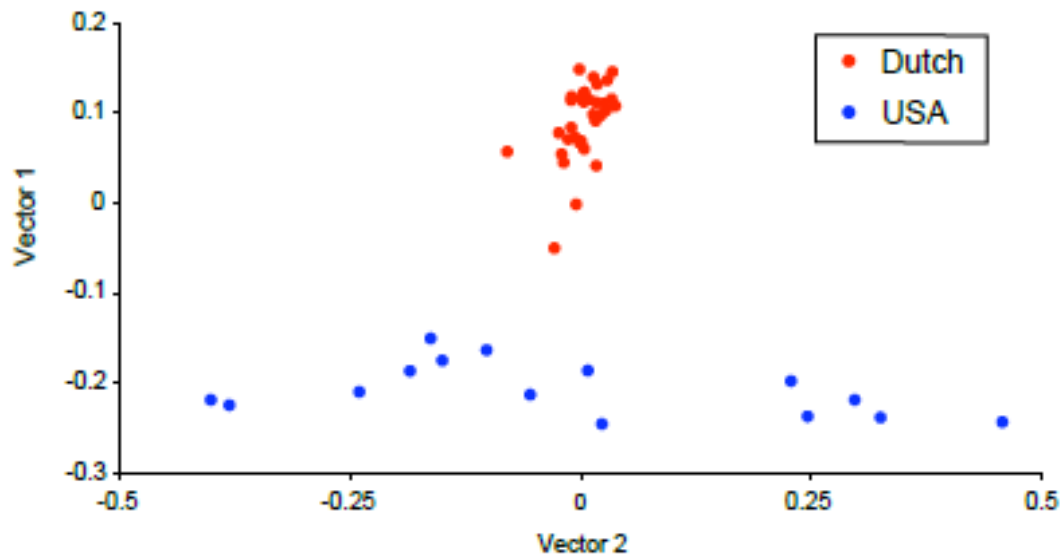


Abb. 9: Vergleich der Populationsschichtung bei Golden Retrievern aufgrund deren Herkunft unter Verwendung von Eigensoft (Harvard University, Cambridge, USA) nach KARLSSON et al. (2007)

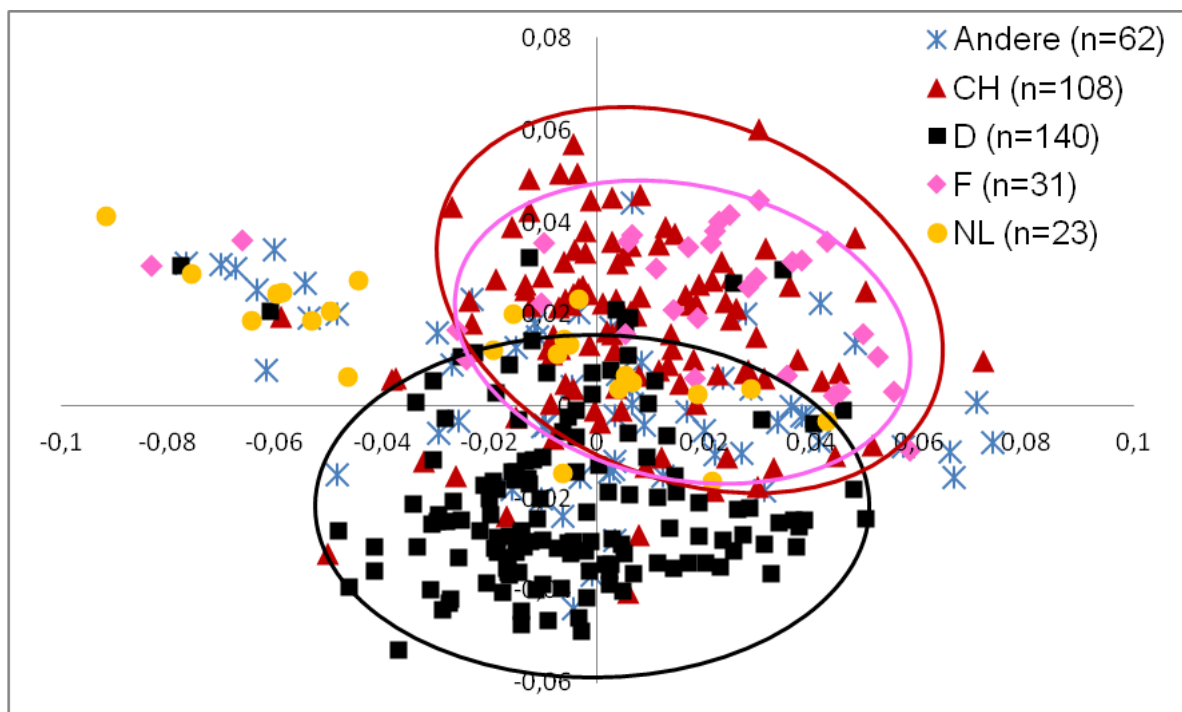


Abb. 10: MDS-Plot der genetischen Verteilung aller 364 Warmblüter nach Zuchtland unter Verwendung von PLINK Software (Harvard University, Cambridge, USA, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>)

4.2.3 Diskussion der Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudien

Das Ziel des Dissertationsprojekts war das Auffinden von QTLs für die COB anhand von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) bei nicht verwandten Warmblütern. Nach Wissen der Autorin handelt es sich um den ersten Gesamtgenomscan mittels EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) bei nicht verwandten Warmblutpferden mit COB.

Für keine der durchgeführten GWAS zur COB konnten nach Permutationsberechnung signifikante Assoziationen erreicht werden.

Zur Absicherung der Methodik wurde in der eigenen Warmblutpopulation eine Assoziationsberechnung zur Fellfarbe Fuchs durchgeführt. Die Fellfarben vererben sich nach einfachen mendelschen Gesetzmäßigkeiten (RIEDER 2009). Die drei Grundfarben des Pferdes Fuchs, Braun und Rappe entstehen als Resultat der interallelen Genwirkung zwischen dem Melanocyte-Stimulating-Hormone-Receptor-1 (MC1R) und dem Agouti-Signaling-Protein (ASIP). Eine Mutation im MC1R-Gen, welches auf Chromosom 3 lokalisiert ist, führt zu einem Funktionsverlust und zur Ausprägung der Fuchsfarbe (HENNER et al. 2002; RIEDER 2009). In dieser GWAS wurden alle Füchse als Fälle gewertet und Pferde mit anderer Fellfarbe als Kontrollen eingesetzt. Wie es bei korrektem Ansatz der Methode zu erwarten war, zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen Chromosom 3 und der Fuchsfarbe. Die Ergebnisse der Assoziationsberechnung im gleichen Material und mit der gleichen Methodik zur Fuchsfarbe belegen, dass der kommerzielle SNP-Chip und die verwendete Software geeignet sind, um bekannte Assoziationen sicher aufzudecken und dass der eigene Ansatz prinzipiell korrekt ist.

Bisher wurde nach Kenntnis der Autorin erst einmal der erfolgreiche Einsatz des EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) bei der Identifizierung einer krankheitsauslösenden Mutation beim Pferd beschrieben. Dabei wurde eine Mutation im Myosin Va-Gen nachgewiesen, die durch eine Basendeletion mit Verschiebung des Leserasters zum letalen Lavender Foal Syndrom (LFS) bei ägyptischen Arabern führt. Bis zu diesem Nachweis wurde ein rezessiver Erbgang nur vermutet. Ansatz für die SNP-Chip-Untersuchung waren beachtliche Parallelen

zwischen dem LFS und Phänotypen, die beim Menschen und der Maus durch kürzlich beschriebene Mutationen hervorgerufen werden. Es wurden dafür sechs betroffene Fohlen und 30 nahe Verwandte in einer GWAS untersucht (BROOKS et al. 2010). Beim LFS handelt es sich um eine monogene Erkrankung und nicht wie in der eigenen Studie um ein komplexes, polygenetisch bedingtes Krankheitsbild. Polygenetische Erkrankungen entstehen durch die additiven Effekte mehrerer Gene und oft durch ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen (BROSNAHAN et al. 2010). Diese Komplexität aufzudecken ist, durch die deutlich höhere Probenanzahl und die größere Anzahl an SNPs viel aufwendiger und kostenintensiver als monogene Merkmale zu charakterisieren (HIRSCHHORN und DALY 2005).

Die Studie von LYKKJEN et al. (2010) hatte das Ziel durch eine GWAS bei norwegischen Trabern mit der Osteochondrosis dissecans (OCD) assoziierte QTLs zu finden. Die OCD ist ebenfalls ein Beispiel einer polygenetisch bedingten Erkrankung. Dazu wurden 80 Fälle mit OCD und 82 Kontrollpferde mit Hilfe des EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) genotypisiert. Die untersuchten Traber stammten von insgesamt 22 Hengsten und 158 Stuten ab und wurden aufgrund der gleichmäßigen geographischen Verteilung der Nachkommen als repräsentativ für die norwegische Traber-Population bewertet. So wurden auch Halbgeschwister und Geschwister einbezogen, was im Vergleich zur vorliegenden Arbeit zu einem deutlich höheren Verwandtschaftsgrad innerhalb der Population führt. Es zeigten sich für zwei SNPs auf Chromosom 10 nach Permutation Wahrscheinlichkeitswerte für das Vorliegen einer Assoziation von je 0,054, die somit sehr nahe am Signifikanzniveau von $< 0,05$ lagen (LYKKJEN et al. 2010). Aus den vielversprechenden Ergebnissen dieser Studie lässt sich ableiten, dass es auch bei polygenetisch bedingten Erkrankungen sinnvoll ist GWAS mit „relativ wenigen“ Probanden durchzuführen. Fraglich ist, ob zur OCD eventuell weniger Gene beitragen als zur Ausprägung der equinen COB. Nach Kenntnis der Autorin liegen diesbezüglich bisher jedoch keine Daten vor.

2011 wurde von DUPUIS et al. eine GWAS bei Pferden mit idiopathischer Hemiplegia laryngis durchgeführt. In die Untersuchung dieser ebenfalls polygenetischen Erkrankung wurden 234 Fälle unterschiedlicher Rassen (196

Warmblüter, 20 Traber, 14 Vollblüter und vier Kaltblüter) mit einer Kehlkopflähmung und 228 Kontrollen (188 Warmblüter, 18 Traber, 16 Vollblüter und sechs Kaltblüter) sowie 69 Elterntiere einbezogen. 15% der Warmblüter waren Halbgeschwister aus sechs Warmblutfamilien. Die übrigen 411 Pferde stammten von 360 Hengsten und 408 Stuten ab, was auch hier eine etwas höhere Verwandtschaft innerhalb der Population im Vergleich zur eigenen Studie zur Folge hat. Da sich bei der Überprüfung der Probanden mittels MDS-Plot offensichtliche genetische Unterschiede zwischen den Rassen darstellten wurden die GWAS ebenfalls nach Rassen getrennt berechnet. In der Warmblutgruppe (n=384) konnten zwei Loci, zum einen auf Chromosom 21 und zum anderen auf 31 als wahrscheinlich bedeutsam hervorgehoben werden, da deren p-Werte nach Bonferroni-Korrektur nur ganz knapp das Signifikanzniveau verfehlten (DUPUIS et al. 2011). Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, GWAS bei komplexen Krankheitsbildern auch mit Probandenzahlen von wenigen Hundert zu starten, um Hinweise auf mögliche Kandidatengene der Krankheitspathogenese zu erhalten. Wahrscheinlich spielt der höhere Verwandtschaftsgrad der Pferde in der OCD- bzw. Hemiplegie-Studie eine Rolle, so dass bei diesen GWAS im Vergleich zur vorliegenden Arbeit zur equinen COB schon relativ vielversprechende Ergebnisse erreicht wurden. In zwei Familienstudien, die dem eigenen Dissertationsprojekt vorangegangen waren, konnte bereits eine Assoziation von Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 13 mit der Ausprägung einer COB nachgewiesen werden (JOST et al. 2007). Zudem fanden sich in einem Geamtgenomscan signifikante QTLs für COB auf Chromosom 13 in der einen Hengstfamilie und auf Chromosom 15 in der anderen Hengstfamilie (SWINBURNE et al. 2009). Vorteilhaft an Familienstudien ist die geringere genetische Variabilität, was die Chance erhöht krankheitsrelevante Polymorphismen innerhalb der eng Verwandten aufdecken zu können. Jedoch spiegeln diese nicht unbedingt den Zustand in der allgemeinen Population wider (GERBER et al. 2008).

In der Humanmedizin wurden Kandidatengene durch GWAS für das Asthma erstmals 2007 (MOFFATT et al. 2007) und für die COPD erstmals 2009 (PILLAI et al. 2009) aufgedeckt. In den letzten beiden Jahren konnten durch Meta-Analysen zahlreiche Genloci mit Assoziation zum humanen Asthma (MOFFATT et al. 2010; FERREIRA et al. 2011) und der humanen COPD (REPAPI et al. 2010; HANCOCK et al. 2010; ARTIGAS et al. 2011) identifiziert werden. Der pathologische Einfluss dieser

Polymorphismen konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. Bei Polymorphismen, die durch GWAS bei komplexen Erkrankungen aufgedeckt werden, handelt es sich in der Regel nicht um kausale Mutationen oder funktionelle Varianten, sondern um solche, welche aufgrund des Kopplungsungleichgewichts mit einer verursachenden Variante gekoppelt sind (WEISS und SILVERMAN 2011).

Die equine COB stellt eine komplexe polygenetische Erkrankung wie das humane Asthma und die humane COPD dar und es ist wahrscheinlich, dass eine Vielzahl an Genloci zu ihrer Entstehung beitragen (SWINBURNE et al. 2009). Die Mehrheit der die Erkrankung gemeinsam verursachenden Varianten dieser Gene hat für sich gesehen jedoch nur einen sehr geringen Einfluss auf den Phänotyp der Erkrankung (WEISS und SILVERMAN 2011).

Grundvoraussetzung für das Auffinden von verursachenden Genvarianten durch eine GWAS ist, dass zumindest die chromosomale Region, idealerweise aber die Genvariante selbst, durch den Chip, der zur Genotypisierung eingesetzt wurde, erfasst wird (DEPNER 2009). SNP-Chips werden im Hinblick auf ein möglichst hohes „coverage“ erstellt, was bedeutet, dass ein möglichst hoher Anteil an häufigen SNPs durch die SNPs auf dem Chip abgedeckt werden soll (BARRETT und CARDON 2006). So kann es sein, dass seltenere Varianten durch GWAS nicht zu finden sind, weil sie durch den Chip nicht erfasst wurden, auch wenn ein Einfluss bereits in anderen Studien (mit anderen SNP-Chips oder anderer Methodik) nachgewiesen wurde (DEPNER 2009).

Aufgrund allgemeiner Powerberechnungen von WADE et al. (2009) ist zu vermuten, dass aufgrund des mäßigen Kopplungsungleichgewichtes und der Polymorphismus-Rate beim Pferd mindestens 100.000 SNPs benötigt werden um Assoziationen durch GWAS aufdecken zu können (WADE et al. 2009). Bisher steht auf dem Markt für das Pferd nur der EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) zur Verfügung, durch den knapp 55.000 SNPs gleichzeitig genotypisiert werden. Ein neuer SNP-Chip für das Pferd, welcher 74.000 SNPs enthalten wird, ist bereits in der Entwicklung. Auch aus den Ergebnissen der eigenen Arbeit und aus den vergleichbaren Untersuchungen zur OCD (LYKKJEN et al. 2010) und zur idiopathischen Hemiplegia laryngis (LYKKJEN et al. 2010) lässt sich ableiten, dass

die Markerdichte des EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) zur Aufklärung komplexer Erkrankungen vermutlich noch zu gering ist.

Eine höhere Markerdichte in Kombination mit einer noch größeren Anzahl geeigneter Pferde würde die Chance steigern, Genloci mit Assoziationen zur COB durch GWAS aufdecken zu können. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass es sich bei diesen Loci direkt um verursachende Varianten handelt (LYKKJEN et al. 2010). Jedoch könnten durch GWAS wahrscheinlich bedeutsame QTLs durch QTL-Analysen oder Kandidatengenanalysen gezielt weiter untersucht werden, um so möglicherweise Varianten beteiligter Gene und deren Auswirkung auf die COB-Pathogenese zu identifizieren.

So ist es SHAKHSI-NIAEI et al. (2011) unter Verwendung u.a. der in der eigenen Untersuchung rekrutierten Probanden durch eine QTL-Analyse gelungen, ein QTL für COB auf Chromosom 13 bei nicht verwandten Warmblütern zu bestätigen. Ausgehend von den Ergebnissen einer Familienstudie von SWINBURNE et al., die bereits ein QTL für COB auf Chromosom 13 (9-29 Megabasen) bei direkten Nachkommen eines Schweizer Warmbluthengstes fanden, wurde dieses QTL an nicht verwandten Warmblütern durch den gezielten Einsatz von 876 SNPs auf Chromosom 13 überprüft. Es wurden dabei sämtliche 364 nicht verwandten Warmblüter aus der eigenen Studie sowie weitere 282 nicht verwandte Warmblutpferde in die QTL-Analyse einbezogen. Alle 646 nicht verwandten Warmblüter wurden zuvor mittels EquineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) genotypisiert. Zusätzliche, gezielt in der QTL-Region eingesetzte SNPs wurden mittels GoldenGate Assay (Illumina®, San Diego, USA) genotypisiert. Wie zuvor auch in der Schweizer Hengstfamilie zeigte der SNP BIEC2-224511 bei den nichtverwandten Warmblütern eine signifikante Assoziation ($p_{\text{raw}} = 0,00037$) zur COB. Das QTL auf Chromosom 13 konnte somit bei den nichtverwandten Warmblutpferden bestätigt werden und wurde weiter bis auf 0,5 Mb (24,0-24,5 Mb) eingeeengt. Es wurde eine Kandidatengenanalyse der vier Gene in dieser chromosomalen Region (24,0-24,5 Mb) durchgeführt, aber es konnte keine Assoziation zu einer codierenden Genvariante identifiziert werden. Wahrscheinlich handelt es sich daher bei der verursachenden Genvariante, die dem QTL zugrunde liegt, um eine Mutation im nicht codierenden Regulationsbereich eines Gens

(SHAKHSI-NIAEI et al. 2011). Solche Regulationsbereiche könnten z.B. der Promotor oder Enhancer eines Gens sein, welche spezifische DNA-Regionen eines Gens darstellen, die durch Bindung von Transkriptionsfaktoren die Transkription eingeleitet oder steigern (PASSARGE 2008b).

Neben dem QTL für COB auf Chromosom 13 stellt ein ebenfalls aus der Familienstudie von SWINEBURNE et al. (2009) hervorgehendes QTL für COB auf Chromosom 15 (40-62 Mb) sicher eine sehr vielversprechende chromosomale Region für eine zukünftige QTL-Analyse bei nicht verwandten Warmblütern dar.

Festzuhalten bleibt, dass in der vorliegenden Arbeit vermutlich die Markerdichte und die Probandenanzahl zu gering waren, um mit der equinen COB assoziierte Genloci aufspüren zu können. Eventuell werden in den kommenden Jahren auch für das Pferd SNP-Chips zur Verfügung stehen, die eine Markerdichte von einer Million SNPs aufweisen, wie sie heute bereits beim Menschen routinemäßig eingesetzt werden (Angaben laut Hersteller: Illumina®, San Diego, USA). Eine Erhöhung der Probandenzahl für GWAS auf ähnliche Größen wie in der Humanmedizin von mehreren Tausenden ist in nächster Zeit z.B. unter internationaler Kooperation mehrerer Arbeitsgruppen oder in einer europäischen Multicenterstudie denkbar, wobei die Kosten für die Analytik hierfür sicher deutlich sinken müssten. Zentrale Datenbanken zum Krankheitsstatus der Pferde könnten es erleichtern solch große Zahlen an geeigneten Probanden zu rekrutieren.

Gerade bei polygenetisch bedingten Krankheiten wie der equinen COB wird es auch nach Identifizierung der beteiligten Gene kaum möglich sein, durch strikte züchterische Auswahl Leiden vollständig zu verhindern. Allerdings kann die Feststellung beteiligter Gene und ihrer Produkte entscheidend zur Aufklärung pathogenetischer Zusammenhänge beitragen und so die Entwicklung neuartiger Therapien, die eventuell auch auf andere Spezies übertragbar sind, ermöglichen. Gerade in Bezug auf das humane Asthma stellt das Pferd und die equine COB ein interessantes Tiermodell dar. Pferderassen können als isolierte, geschlossene Populationen angesehen werden und verfügen im Vergleich zum Menschen über eine begrenzte genetische Heterogenität, was es prinzipiell erleichtert einen krankheitsassoziierten Genotyp zu identifizieren (SWINEBURNE et al. 2009). Daher erscheint eine Erhöhung der Probandenzahl sowie eine weitere Steigerung der SNP-

Diskussion – Ergebnisse

Anzahl pro SNP-Chip-Untersuchung zur Aufdeckung der COB-Pathogenese weiterhin sinnvoll.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Das Dissertationsprojekt beinhaltet den ersten Gesamtgenomscan zur COB bei nicht verwandten Warmblutpferden durch Einsatz des Equine SNP50 Genotyping BeadChip (Illumina®, San Diego, USA) und schafft damit die Grundlage für Folgearbeiten zur Aufdeckung der COB-Pathogenese anhand von SNP-Chip-Untersuchungen.
- Das selbst entwickelte Score-System ermöglicht durch die semiquantitative Bewertung von Besitzerangaben zur Lungengesundheit ihrer Pferde die vier HOARSI-Kategorien in eine differenziertere Systematik zu überführen.
- Die Berechnungen zur genetischen Variabilität innerhalb der Studienpopulation (n=364) anhand von multidimensionalen Skalierungen belegen, dass es sich bei den untersuchten, bis einschließlich der Großelterngeneration nicht verwandten Warmblutpferden um eine genetisch einheitliche Gruppe handelt, die somit gut zur Auffindung von krankheitsrelevanten Polymorphismen durch genomweite Assoziationsstudien geeignet sein sollte.
- Durch die Berechnung der genomweiten Assoziationen zur Fuchsfarbe mit derselben Methodik und demselben Material konnte gezeigt werden, dass die Methode geeignet ist, um bekannte genetische Assoziationen aufdecken zu können.
- Mittels genomweiter Assoziationsstudien ist es am eigenen Material bislang nicht gelungen signifikante Assoziationen zwischen SNPs und der COB nachzuweisen. Es ist folglich eine höhere Anzahl an Probanden bzw. eine höhere Markerdichte erforderlich, um krankheitsassoziierte Genvarianten durch einen Gesamtgenomscan bei nicht verwandten Warmblütern mit COB aufdecken zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Gesamtgenomscan bei bis in die Großelterngeneration nicht verwandten Warmblutpferden mit COB zur Identifizierung krankheitsrelevanter Genvarianten im Rahmen einer Fall-Kontrollstudie durchgeführt. Dazu wurden Proben in der Schweiz und in Deutschland gesammelt. Insgesamt 364 Pferde konnten in die Studie innerhalb von zwei Jahren eingeschlossen werden. Die Warmblüter wurden anhand der Auswertung eines standardisierten und validierten Fragebogens (RAMSEYER et al. 2007; LAUMEN et al. 2010) in Bezug auf ihren COB-Status in chronisch lungenkranke Fälle (n=186) und lungengesunde Kontrollen (n=178) eingeteilt. Zur semiquantitativen Auswertung der Besitzerangaben wurde ein Score-System entwickelt, welches eine differenziertere Bewertung der Schwere der Symptome ermöglicht. Aus EDTA-stabilisierten Blutproben erfolgte die DNA-Isolierung am Institut für Genetik der Vetsuisse-Fakultät Bern. Anschließend wurde am Department of Genetics des Animal Health Trust in Newmarket eine Genotypisierung durch Überprüfung von 54.602 SNPs mittels EquineSNP50 Genotyping Bead Chip (Illumina®, San Diego, USA) durchgeführt. Anhand der Berechnung von multidimensionalen Skalierungen konnte eine hohe genetische Ähnlichkeit innerhalb der Warmblutpopulation sowie zwischen Fällen und Kontrollen dargestellt werden. Durch Kombination der Genotypinformationen mit den Phänotypangaben wurden genomweite Assoziationsstudien berechnet. Im Gegensatz zum Nachweis von QTLs für COB auf Chromosom 13 und 15 durch einen Gesamtgenomscan von SWINEBURNE et al. (2009) bei direkten Nachkommen zweier Schweizer Warmbluthengsten konnten in der vorliegenden Arbeit bei den nicht verwandten Warmblütern nach Permutationsberechnung keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen festgestellt werden. Durch Berechnung der genomweiten Assoziationen zur Fuchsfarbe in der eigenen Studienpopulation mit dem gleichen Material und mit derselben Methodik konnte eine hochsignifikante Assoziation ($EMP2 = 0,001$) zu Chromosom 3, auf dem das für die Fuchsfarbe verantwortliche Gen liegt, gezeigt werden. Somit konnte bestätigt werden, dass die Methodik geeignet ist um vorhandene Assoziationen aufzudecken.

Es ist wahrscheinlich, dass zum einen die Probandenanzahl von 364 Warmblütern und zum anderen die Markerdichte des eingesetzten EquineSNP50 Genotyping

Zusammenfassung

Bead Chip noch zu gering waren, um mit der equinen COB assoziierte Genloci aufspüren zu können. Zur Aufdeckung von an der COB-Pathogenese beteiligten Genen wird eine weitere Erhöhung der Probandenzahl sowie eine Steigerung der Markerichte pro SNP-Chip-Untersuchung weiterhin als sinnvoll erachtet. Erste vielversprechende Ergebnisse in dieser Richtung wurden u.a. unter Verwendung des eigenen Materials durch SHAKHSI-NIAEI et al. (2011) publiziert. Mittels QTL-Analyse auf Chromosom 13 konnte eine signifikante Assoziation des SNPs BIEC2-224511 bei nicht verwandten Warmblütern (n=646) zur COB gezeigt werden und das QTL bis auf 0,5 Mb eingegrenzt werden. Die Identifizierung beteiligter Gene wird als Grundlage zur Aufklärung der COB-Pathogenese und damit zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze dienen, welche eventuell auch auf den Menschen oder andere Spezies übertragbar sind.

7 SUMMARY

In a case-control study with the aim to identify RAO associated genetic variants, a whole genome scan in Warmblood horses was undertaken. Horses were not related until three generations back. Samples were collected in Switzerland and in Germany. Overall 364 horses were included into the study within two years. They were graded into cases (n=186) and controls (n=176) according to their RAO status using a standardized and validated questionnaire (RAMSEYER et al. 2007; LAUMEN et al. 2010). A score-system was developed to semiquantitatively evaluate the information obtained from horse owners. This score allows a detailed assessment of the severity of the symptoms. DNA was isolated from EDTA-blood at the Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, University of Bern. For genotyping 54.602 SNPs were tested at the Department of Genetics, Animal Health Trust in Newmarket using the EquineSNP50 Genotyping Bead Chip (Illumina®, San Diego, USA). By calculating multidimensional scaling a high genetic resemblance was identified within the Warmblood population and between cases and controls. Genome-wide association studies (GWAS) were performed by combining genotype information and phenotype data. In contrast to earlier studies which showed evidence for QTLs for RAO on chromosome 13 and 15 in two Swiss halfsibling families, there were no significant differences between cases and controls after permutation testing within the unrelated Warmblood horses. GWAS for the chestnut coat colour in this population using the same material and the same method showed a highly significant association ($P = 0,001$) to chromosome 3. Inheritance of the chestnut phenotype is already known and the responsible gene is located on chromosome 3. The detection of this association confirmed the accuracy of the method used for this study.

Presumably the number of 364 subjects and the SNP frequency of the EquineSNP50 Genotyping Bead Chip (Illumina®, San Diego, USA) used in the present study were too low to identify genetic loci associated with RAO. To discover genes involved in the RAO-pathogenesis an increased number of horses as well as genetic markers are still considered to be useful. First promising results are already published by SHAKHSI-NIAEI et al. (2011), who combined results from the study presented here as well as new material (n=646). They performed a QTL-analysis on chromosome 13 and the SNP BIEC2-224511 showed significant association to RAO in unrelated

Summary

Warmblood horses. This association study allows further narrowing of the QTL interval to about 0.5 Mb. Identifying participating genes will provide a basis for clarification of RAO-pathogenesis and thereby support the development of new therapeutic strategies, which possibly are assignable to human beings or other species.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. (2010):

A map of human genome variation from population-scale sequencing.
Nature 467 [7319], 1061-1073

AINSWORTH, D. M. (2010):

Review of Recurrent Airway Obstruction (RAO, Heaves): Diagnosis and Treatment Options. Proceeding of the American Association of Equine Practitioners - Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases; Salt Lake City, UT, USA -2010 , 93-99

AINSWORTH, D. M. et al. (2003):

Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells.
Vet.Immunol.Immunopathol. 96 [1-2], 83-91

AKHABIR, L. und Sandford, A. J. (2011):

Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma.
Respirology. 16 [3], 396-406

ARTIGAS, M. S. et al. (2011):

Genome-wide association and large-scale follow up identifies 16 new loci influencing lung function.
Nat.Genet. 43 [11], 1082-1090

BARNES, K. C. (2011):

Successfully mapping novel asthma loci by GWAS.
Lancet 378 [9795], 967-968

BARNES, P. J.; Shapiro, S. D. und Pauwels, R. A. (2003):

Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms.
Eur.Respir.J. 22 [4], 672-688

BARRETT, J. C. und Cardon, L. R. (2006):

Evaluating coverage of genome-wide association studies.
Nat.Genet. 38 [6], 659-662

BRACHER, V. et al. (1991):

An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses.
Equine Vet.J. 23 [2], 136-141

BROOKS, S. A. et al. (2010):

Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome.
PLoS.Genet. 6 [4], e1000909

Literaturverzeichnis

- BROSNAHAN, M. M.; Brooks, S. A. und Antczak, D. F. (2010):
Equine clinical genomics: A clinician's primer.
Equine Vet.J. 42 [7], 658-670
- CARDON, L. R. und Bell, J. I. (2001):
Association study designs for complex diseases.
Nat.Rev.Genet. 2 [2], 91-99
- CASTALDI, P. J. et al. (2009):
Genetic associations with hypoxemia and pulmonary arterial pressure in COPD.
Chest 135 [3], 737-744
- CHA, S. I. et al. (2009):
SERPINE2 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease.
J.Korean Med.Sci. 24 [6], 1119-1125
- CHAE, S. C. et al. (2007):
Identification of polymorphisms in human interleukin-27 and their association with asthma in a Korean population.
J.Hum.Genet. 52 [4], 355-361
- CHAPMAN, K. R. et al. (2006):
Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease.
Eur.Respir.J. 27 [1], 188-207
- CHO, M. H. et al. (2010):
Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease.
Nat.Genet. 42 [3], 200-202
- CHOWDHARY, B. P. und Raudsepp, T. (2008):
The horse genome derby: racing from map to whole genome sequence.
Chromosome.Res. 16 [1], 109-127
- COOKE, R. A. und Vander Veer, A. Jr. (1916):
Human sensitization.
J.Immunol. 1 , 201-305
- COUETIL, L. L. et al. (2007):
Inflammatory airway disease of horses.
J.Vet.Intern.Med. 21 [2], 356-361
- COUETIL, L. L. und Ward, M. P. (2003):
Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999).
J.Am.Vet.Med.Assoc. 223 [11], 1645-1650
- DEBRUE, M. et al. (2005):
Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells.
Vet.Immunol.Immunopathol. 105 [1-2], 25-31

Literaturverzeichnis

- DEEGEN, E. (1992):
Entwicklung der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen des Pferdes in den letzten 20 Jahren.
Ventipulmin 2000, Symposium zur Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen des Pferdes. Bingen 21.09.1992 Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Referatsammlung, 1-5
- DEEGEN, E. (2005):
Brustkorb, Atemmuskeln und Brusthöhle mit Inhalt.
In: Wissdorf, H., Gerhards, H., Huskamp, B. und Deegen, E.: Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes, Schaefer, Hannover, 868-867
- DEEGEN, E. et al. (1987):
Zur Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis beim Pferd: Klinische und funktionelle Parameter sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde. 17. Kongr. d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Bad Nauheim, 1987, 242-253
- DEMEO, D. L. et al. (2009):
Integration of genomic and genetic approaches implicates IREB2 as a COPD susceptibility gene.
Am.J.Hum.Genet. 85 [4], 493-502
- DEPNER, M. (2009):
Genetische Determinanten von Asthma - Methodik und Anwendung.
München, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, biol. hom. Diss.
- DERKSEN, F. J. (1993):
Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition.
Equine Vet.J. 25 [4], 257-258
- DERKSEN, F. J. und Robinson, N. E. (2002):
Overview of the equine respiratory system.
In: Lekeux, P.: Equine Respiratory Disease, International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2002; B0301.0302
- DIXON, P. M.; Railton, D. I. und McGorum, B. C. (1995):
Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses.
Equine Vet.J. 27 [6], 416-421
- DUDEN. (2010):
Fremdwörterbuch. Dudenverlag, Mannheim [10. Auflage, Band 5]
- DUPUIS, M. C. et al. (2011):
Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse.
Mamm.Genome 22 [9-10], 613-620

EMPEY, D. W. et al. (1976):

Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection.

Am.Rev.Respir.Dis. 113 [2], 131-139

EWART, S. L. und Robinson, N. E. (2007):

Genes and respiratory disease: a first step on a long journey.

Equine Vet.J. 39 [3], 270-274

FALK, M. U. (2007):

Die Rolle der Kinase ERK2 und ERK2 sowie des Transkriptionsfaktors Erg-1 in der Genetik des kindlichen Asthma bronchiale.

Freiburg, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität, med. Diss.

FEIGE, K.; Furst, A. und Eser, M. W. (2002):

Auswirkungen von Haltung, Fütterung und Nutzung auf die Pferdegesundheit unter besonderer Berücksichtigung respiratorischer und gastrointestinaler Krankheiten.

Schweiz.Arch.Tierheilkd. 144 [7], 348-355

FERREIRA, M. A. et al. (2011):

Identification of IL6R and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma.

Lancet 378 [9795], 1006-1014

FEY, K. (2005):

Der klinische Nutzen zytologischer Untersuchungen von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit bei der Differenzierung chronischer Bronchitiden des Pferdes.

DVG Service GmbH, Giessen, Veterinärmedizinische Fakultät der Justus-Liebig Universität, vet. med. Habil.

FEY, K. (2006):

Nichtinfektiöse Krankheiten der tiefen Atemwege und der Lunge.

In: Dietz, O. und Huskamp, B.: Handbuch Pferdepraxis, Enke Verlag, Stuttgart, 326-336

FRANCHINI, M. et al. (1998):

The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Vet.Immunol.Immunopathol. 66 [1], 53-65

GALANTER, J. et al. (2008):

ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations.

Am.J.Respir.Crit Care Med. 177 [11], 1194-1200

GELDERMANN, H. (2005):

Darstellung von DNA-Varianten.

In: Geldermann, H.: Tierbiotechnologie, UTB, Ulm, 198-230

- GERBER, H. (1989):
Sir Frederick Hobday memorial lecture. The genetic basis of some equine diseases.
Equine Vet.J. 21 [4], 244-248
- GERBER, V. et al. (2009):
Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction.
J.Vet.Intern.Med. 23 [3], 626-630
- GERBER, V. et al. (2003):
Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses.
Equine Vet.J. 35 [5], 491-495
- GERBER, V. et al. (2008):
Genetik der rezidivierenden Atemwegsobstruktion (RAO).
Dtsch.Tierarztl.Wochenschr. 115 [7], 271-275
- GINA. (2011):
Global Strategy for Asthma Management and Prevention.
www.ginasthma.org
- GOLD. (2011):
Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
www.goldcopd.org
- GUDBJARTSSON, D. F. et al. (2009):
Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction.
Nat.Genet. 41 [3], 342-347
- HANCOCK, D. B. et al. (2010):
Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function.
Nat.Genet. 42 [1], 45-52
- HEAD, M. J. und Wood, J. L. (2001):
Coughing: a source of irritation?
Equine Vet.J. 33 [3], 221-223
- HECKER, M. et al. (2003):
Novel genetic variation of human interleukin-21 receptor is associated with elevated IgE levels in females.
Genes Immun. 4 [3], 228-233
- HENNER, J. et al. (2002):
[Horse breeding: genetic tests for the coat colors chestnut, bay and black. Results from a preliminary study in the Swiss Freiberger horse breed].
Schweiz.Arch.Tierheilkd. 144 [8], 405-412

- HERSZBERG, B. et al. (2006):
Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling.
J.Allergy Clin.Immunol. 118 [2], 382-388
- HIMES, B. E. et al. (2009):
Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene.
Am.J.Hum.Genet. 84 [5], 581-593
- HIRSCHHORN, J. N. und Daly, M. J. (2005):
Genome-wide association studies for common diseases and complex traits.
Nat.Rev.Genet. 6 [2], 95-108
- HOFFMANN, F. (2006):
SNPs: Die große Bedeutung der kleinen Unterschiede.
In: La Roche AG Corporate Communications: Gene und Gesundheit
www.roche.com/.../genetics_and_genomics.htm
- HOGG, J. C. et al. (2004):
The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.
N.Engl.J.Med. 350 [26], 2645-2653
- HOMMA, S. et al. (2006):
Association of phosphodiesterase 4D gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease: relationship to interleukin 13 gene polymorphism.
Int.J.Mol.Med. 18 [5], 933-939
- HOTCHKISS, J. W.; Reid, S. W. und Christley, R. (2006):
Construction and validation of a risk-screening questionnaire for the investigation of recurrent airway obstruction in epidemiological studies of horse populations in Great Britain.
Prev.Vet.Med. 75 [1-2], 8-21
- HOTCHKISS, J. W.; Reid, S. W. und Christley, R. M. (2007):
A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction.
Equine Vet.J. 39 [4], 301-308
- HUANG, S. L.; Su, C. H. und Chang, S. C. (1997):
Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 156 [5], 1436-1439
- HUMENY, A. (2001):
Analyse genetischer Heterogenitäten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie: Methodenentwicklung und diagnostische Applikation.
Erlangen-Nürnberg, Medizinische Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität, rer. nat. Habil.

- HYTONEN, A. M. et al. (2004):
Haplotypes of the interleukin-4 receptor alpha chain gene associate with susceptibility to and severity of atopic asthma.
Clin.Exp.Allergy 34 [10], 1570-1575
- IHN, H. (2002):
Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF.
Curr.Opin.Rheumatol. 14 [6], 681-685
- ILES, M. M. (2008):
What can genome-wide association studies tell us about the genetics of common disease?
PLoS.Genet. 4 [2], e33
- JOST, U. et al. (2007):
A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses.
Equine Vet.J. 39 [3], 236-241
- KARLSSON, E. K. et al. (2007):
Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association.
Nat.Genet. 39 [11], 1321-1328
- KEATINGS, V. M. et al. (1996):
Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 153 [2], 530-534
- KIM, S. H. et al. (2007):
Association between polymorphisms in prostanoid receptor genes and aspirin-intolerant asthma.
Pharmacogenet.Genomics 17 [4], 295-304
- KIM, W. J. et al. (2009):
Genetic association analysis of COPD candidate genes with bronchodilator responsiveness.
Respir.Med. 103 [4], 552-557
- KNUDSON, R. J. (1985):
James Jackson, Jr., the young pulmonologist who described familial emphysema. An historical footnote.
Chest 87 [5], 673-676
- KOCH, P. (1957):
Über die Erbllichkeit des chronisch alveolären Lungenemphysems des Pferdes.
Dtsch.Tierärztl.Wochenschr. 64 [20], 485-486

Literaturverzeichnis

LAI, C. K. et al. (2009):

Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).
Thorax 64 [6], 476-483

LARSON, V. L. und Busch, R. H. (1985):

Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings.
Am.J.Vet.Res. 46 [1], 144-146

LAUMEN, E.; Doherr, M. G. und Gerber, V. (2010):

Relationship of horse owner assessed respiratory signs index to characteristics of recurrent airway obstruction in two Warmblood families.
Equine Vet.J. 42 [2], 142-148

LAVOIE, J. P. (2009):

Heaves in horses: allergy or non-specific response to environmental antigens?
11th Geneva Congress on Equine Medicine and Surgery, 15-17 December 2009 ,
23-26

LAVOIE, J. P. et al. (2001):

Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 164 [8], 1410-1413

LEGUILLETTE, R. (2003):

Recurrent airway obstruction--heaves.
Vet.Clin.North Am.Equine Pract. 19 [1], 63-86

LONDON, S. J. (2007):

Gene-air pollution interactions in asthma.
Proc.Am.Thorac.Soc. 4 [3], 217-220

LOS, H.; Postmus, P. E. und Boomsma, D. I. (2001):

Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies.
Twin.Res. 4 [2], 81-93

LOWELL, F. C. (1990):

Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. 1964.
Allergy Proc. 11 [3], 149-150

LYKKJEN, S. et al. (2010):

Genome-wide association analysis of osteochondrosis of the tibiotarsal joint in Norwegian Standardbred trotters.
Anim Genet. 41 Suppl 2 , 111-120

MacNEE, W. (2005):

Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.
Proc.Am.Thorac.Soc. 2 [4], 258-266

- MAIR, T. S. und Derksen, F. J. (2000):
Chronic obstructive pulmonary disease: a review.
Equine Vet.Ed. 12 [1], 35-44
- MARR, C. M. (2010):
Heart failure. In: Marr, C.M. and Bowen, I.M.: Cardiology of the Horse, Saunders
Elsevier, [19], 239-252
- MARTI, E. et al. (1991):
The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity
bronchitis.
Equine Vet.J. 23 [6], 457-460
- McCLOSKEY, S. C. et al. (2001):
Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a
significant risk of airflow obstruction.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 164 [8 Pt 1], 1419-1424
- McGORUM, B. C.; Dixon, P. M. und Halliwell, R. E. (1993):
Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to
inhalation challenges with mould antigens.
Equine Vet.J. 25 [4], 261-267
- McPHERSON, E. A. et al. (1978):
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses.
Equine Vet.J. 10 [1], 47-53
- MISKOVIC, M.; Couetil, L. L. und Thompson, C. A. (2007):
Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway
obstruction maintained in low-dust environments.
J.Vet.Intern.Med. 21 [5], 1060-1066
- MOFFATT, M. F. et al. (2010):
A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma.
N.Engl.J.Med. 363 [13], 1211-1221
- MOFFATT, M. F. et al. (2007):
Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood
asthma.
Nature 448 [7152], 470-473
- MORRIS, E. A. und Seeherman, H. J. (1991):
Clinical evaluation of poor performance in the racehorse: the results of 275
evaluations.
Equine Vet.J. 23 [3], 169-174
- MURPHY, D. M. und O'Byrne, P. M. (2010):
Recent advances in the pathophysiology of asthma.
Chest 137 [6], 1417-1426

Literaturverzeichnis

NAKAE, S. et al. (2007):

Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice.

Blood 109 [9], 3640-3648

NICHOLAS, F. W. (2010a):

Molecular biology.

In: Nicholas, F.W.: introduction to veterinary genetics, Wiley-Blackwell , 46-84

NICHOLAS, F. W. (2010b):

Quantitative variation.

In: Nicholas, F.W.: introduction to veterinary genetics, Wiley-Blackwell , 216-228

NICHOLAS, F. W. (2010c):

Single genes in populations.

In: Nicholas, F.W.: introduction to veterinary genetics, Wiley-Blackwell , 121-138

NUSSBAUMER, P. I. (2009):

Resistance against Strongylid Nematodes in two high prevalence Equine Recurrent Airway Obstruction Families has a genetic basis.

Bern, Vetsuisse-Fakultät, vet. med. Diss.

OLSZEWSKI, M. A. et al. (1999):

Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways.

Am.J.Physiol 276 [3 Pt 1], L522-L529

PASSARGE, E. (2008a):

Genomik.

In: Passarge, E.: Taschenatlas Humangenetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 188-209

PASSARGE, E. (2008b):

Grundlagen.

In: Passarge, E.: Taschenatlas Humangenetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 16-184

PENE, J. et al. (2008):

Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes.

J.Immunol. 180 [11], 7423-7430

PETERS, L. (2003):

Die Bedeutung von SNPs und Haplotypen.

In: Peters, L.: Pharmokogenetik (Teil III)

www.boa-muenchen.org/linde.peters/phargen3.htm

PILLAI, S. G. et al. (2009):

A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci.
PLoS.Genet. 5 [3], e1000421

PSCHYREMBEL. (1998):

Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York

PURCELL, S. et al. (2007):

PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses.
Am.J.Hum.Genet. 81 [3], 559-575

RAMSEYER, A. et al. (2007):

Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses.
J.Vet.Intern.Med. 21 [1], 149-156

REDLINE, S. et al. (1987):

Assessment of genetic and nongenetic influences on pulmonary function. A twin study.
Am.Rev.Respir.Dis. 135 [1], 217-222

REPAPI, E. et al. (2010):

Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function.
Nat.Genet. 42 [1], 36-44

RIEDER, S. (2009):

Molecular tests for coat colours in horses.
J.Anim Breed.Genet. 126 [6], 415-424

ROBINSON, N. E. (2001):

International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000.
Equine Vet.J. 33 [1], 5-19

ROBINSON, N. E. et al. (1996):

The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses.
Br.Vet.J. 152 [3], 283-306

SASAKI, Y. et al. (2005):

IL-18 with IL-2 protects against Strongyloides venezuelensis infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity.
J.Exp.Med. 202 [5], 607-616

SCHÄPER, W. (1939):

Untersuchungen über die Erbllichkeit und das Wesen des Lungendampfes beim Pferd.
Tierärztliche Rundschau 45 [31], 595-601

- SEBASTIANI, P. et al. (2009):
Genome-wide association studies and the genetic dissection of complex traits.
Am.J.Hematol. 84 [8], 504-515
- SELBY, C. und MacNee, W. (1993):
Factors affecting neutrophil transit during acute pulmonary inflammation:
minireview.
Exp.Lung Res. 19 [4], 407-428
- SENG, K. C. und Seng, C. K. (2008):
The success of the genome-wide association approach: a brief story of a long
struggle.
Eur.J.Hum.Genet. 16 [5], 554-564
- SHAKHSI-NIAEI, M. et al. (2011):
Replication and fine-mapping of a QTL for recurrent airway obstruction (RAO) in
European Warmblood horses.
Anim Genet.
- SHAMIM, Z. et al. (2007):
Association between genetic polymorphisms in the human interleukin-7 receptor
alpha-chain and inhalation allergy.
Int.J.Immunogenet. 34 [3], 149-151
- SILVERMAN, E. K. et al. (2002):
Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe
early-onset chronic obstructive pulmonary disease.
Am.J.Hum.Genet. 70 [5], 1229-1239
- SLEIMAN, P. M. et al. (2008):
ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of
European ancestry.
J.Allergy Clin.Immunol. 122 [6], 1225-1227
- SLEIMAN, P. M. und Hakonarson, H. (2010):
Recent advances in the genetics and genomics of asthma and related traits.
Curr.Opin.Pediatr. 22 [3], 307-312
- SMITH, C. A. und Harrison, D. J. (1997):
Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and
susceptibility to emphysema.
Lancet 350 [9078], 630-633
- SPAIN, W. C. und Cooke, R. A. (1924):
Studies in specific hypersensitiveness. XI. The familial occurrence of hay fever and
bronchial asthma.
J.Immunol. 9 , 521-569

SWINBURNE, J. E. et al. (2009):

A whole-genome scan for recurrent airway obstruction in Warmblood sport horses indicates two positional candidate regions.

Mamm.Genome 20 [8], 504-515

TAKIZAWA, H. et al. (2001):

Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Am.J.Respir.Crit Care Med. 163 [6], 1476-1483

THEIN, P. (2006):

Infektionskrankheiten.

In: Dietz, O. und Huskamp, B.: Handbuch Pferdepraxis, Enke Verlag, Stuttgart , 349-379

TITUS, R. G.; Sherry, B. und Cerami, A. (1991):

The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites.

Immunol.Today 12 [3], A13-A16

TRAUB, P. M. (2005):

Klinische und immunologische Untersuchung zur Ausprägung der Chronisch Obstruktiven Bronchitis des Pferdes: Gibt es Hinweise auf eine hyperreagible und eine dyskrinische Form? Hannover, Tierärztliche Hochschule, vet. med. Diss.

TREMBLAY, G. M. et al. (1993):

Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses.

Equine Vet.J. 25 [3], 194-197

VIGNOLA, A. M. et al. (2003):

Airway remodeling in asthma.

Chest 123 [3 Suppl], 417S-422S

VOGELMEIER, C. et al. (1997):

Comparative loss of activity of recombinant secretory leukoprotease inhibitor and alpha 1-protease inhibitor caused by different forms of oxidative stress.

Eur.Respir.J. 10 [9], 2114-2119

VOGELMEIER, C. et al. (2006):

[Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease].

Internist (Berl) 47 [9], 885-90, 892

VON MUTIUS, E. (2009):

Gene-environment interactions in asthma.

J.Allergy Clin.Immunol. 123 [1], 3-11

Literaturverzeichnis

WADE, C. M. et al. (2009):

Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse.

Science 326 [5954], 865-867

WAGNER, B. (2009):

IgE in horses: occurrence in health and disease.

Vet.Immunol.Immunopathol. 132 [1], 21-30

WAKASHIN, H. et al. (2008):

IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice.

Am.J.Respir.Crit Care Med. 178 [10], 1023-1032

WARNER, S. M. und Knight, D. A. (2008):

Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma.

Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol. 8 [1], 44-48

WEISS, S. T. und Silverman, E. K. (2011):

Pro: Genome-Wide Association Studies (GWAS) in Asthma.

Am.J.Respir.Crit Care Med. 184 [6], 631-633

WINDER, N. C. und von Fellenberg, R. (1987):

Chronic small airway disease in horses slaughtered in Switzerland.

Schweiz.Arch.Tierheilkd. 129 [11], 585-593

WU, L. et al. (2004):

Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease.

Thorax 59 [2], 126-129

9 ANHANG

9.1 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Genloci mit genomweit signifikanter Assoziation zu Asthma aus GABRIEL Consortium (MOFFATT et al. 2010)	7
Tab. 2:	Genloci mit genomweit signifikanter Assoziation zu gestörter Lungenfunktion bei COPD-Patienten	15
Tab. 3:	Score-Punktverteilung für Angaben aus Fragebogen	41
Tab. 4:	Ergebnisse der Auswertung von Besitzerangaben anhand von Score-Punkten für HOARSI	51
Tab. 5:	Gruppenvergleich	52
Tab. 6:	Aufteilung der Warmblüter nach Zuchtland	52
Tab. 7:	Aufteilung der deutschen Warmblüter nach Zuchtgebiet	53

9.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	MDS-Plot der genetischen Verteilung der in der Schweiz und in Deutschland gesammelten Proben	54
Abb. 2:	MDS-Plot der genetischen Verteilung aller Fälle und aller Kontrollen	55
Abb. 3:	Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot ohne Permutation für HOARSI für alle 364 Warmblüter	58
Abb. 4:	Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot nach Permutation für HOARSI für alle 364 Warmblüter	59
Abb. 5:	Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot ohne Permutation für schlechte Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut	61
Abb. 6:	Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot nach Permutation für schlechte Leistung in der Rassengruppe deutsches Warmblut	61
Abb. 7:	Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot ohne Permutation für Fuchsfarbe	63
Abb. 8:	Darstellung der genomweiten Phänotyp-Assoziation als Manhattan-Plot nach Permutation für Fuchsfarbe gegen andere Fellfarben	64
Abb. 9:	Vergleich der Populationsschichtung bei Golden Retrievern aufgrund deren Herkunft unter Verwendung von Eigensoft	88
Abb. 10:	MDS-Plot der genetischen Verteilung aller 364 Warmblüter nach Zuchtland unter Verwendung von PLINK Software	88

9.3 DATENVERZEICHNIS

Tab. I: Ergebnisse der GWAS

	FÄLLE [Score-Punkte]	n Fälle	KONTROLLEN [Score-Punkte]	n Kontr.	EMP2	-log10 (EMP2)	Chr.	Mb	SNP
ANALYSE BEI ALLEN 364 WARMBLÜTERN									
HOARSI	HOARSI 3/4	186	HOARSI 1	178	0,37	0,43	11	22	BIEC2-143784
HOARSI 1/4	HOARSI 4	148	HOARSI 1	178	0,96	0,018	1	18	BIEC2-8707
Husten	regelmäßig [3]/ständig [5]	186	kein Husten [0]	178	0,38	0,42	11	22	BIEC2-143784
muköser NA	vorhanden [1]	153	kein NA [0]	211	0,18	0,74	22	48	BIEC2-601565
HOARSI 3/4: muköser NA	vorhanden [1]	153	kein NA [0]	33	0,69	0,16	15	35	BIEC2-302543
angestrengte Atmung bei Bel.	angestrengt [2]	148	normal [0]	216	0,68	0,17	11	14	BIEC2-140512
angestrengte Atmung in Ruhe	angestrengt [3]	94	normal [0]	270	0,69	0,16	1	104	BIEC2-44689
verlangsamte Wiederber.	langsam [1]/sehr langsam [2]	124	normal [0]	240	0,94	0,027	1	73	BIEC2-31081
schlechte Leistung	schlecht [2]	93	gut [0]/sehr gut [0]	218	0,17	0,77	19	44	BIEC2-442025
schlechte Motivation	schlecht [1]	28	sehr gut [0]/gut [0]/ausreichend [0]	336	0,69	0,16	8	29	BIEC2-1040968
ANALYSE INNERHALB DER RASSENGRUPPE DEUTSCHES WARMBLUT									
D WB: HOARSI	HOARSI 3/4	n=76	HOARSI 1	n=64	0,992	0,0035	2	51	BIEC2-477865
D WB: Husten	regelmäßig [3]/ständig [5]	n=76	kein Husten [0]	n=64	0,997	0,0013	2	51	BIEC2-477865
D WB: muköser NA	vorhanden [1]	n=68	kein NA[0]	n=72	0,69	0,16	19	42	BIEC2-440806
D WB: Atmung bei Bel.	angestrengt [2]	n=65	normal [0]	n=75	0,42	0,37	10	40	BIEC2-118643
D WB: Atmung in Ruhe	angestrengt [3]	n=39	normal [0]	n=101	0,34	0,47	31	15	BIEC2-837853
D WB: Wiederber.	langsam [1]/sehr langsam [2]	n=50	normal [0]	n=90	0,53	0,28	10	40	BIEC2-118643
D WB: Leistung	schlecht [2]	n=27	gut [0]/sehr gut [0]	n=81	0,067	1,17	10	40	BIEC2-118643

Fortsetzung Tab.I:

	FÄLLE [Score-Punkte]	n Fälle	KONTROLLEN [Score-Punkte]	n Kontr.	EMP2	-log10 (EMP2)	Chr.	Mb	SNP
ANALYSE INNERHALB DER RASSENGRUPPE SCHWEIZER UND FRANZÖSISCHES WARMBLUT									
CH/F WB: HOARSI	HOARSI 3/4	65	HOARSI 1	74	0,14	0,85	3	40	BIEC2-778574
CH/F WB: Husten	regelmäßig [3]/ständig [5]	65	kein Husten [0]	74	0,17	0,77	3	40	BIEC2-778574
CH/F WB: muköser NA	vorhanden [1]	50	kein NA [0]	89	0,12	0,92	1	50	BIEC2-21537/- 21539
CH/F WB: Atmung bei Bel.	angestrengt [2]	50	normal [0]	89	0,79	0,1	15	52	BIEC2-310992
CH/F WB: Atmung in Ruhe	angestrengt [3]	28	normal [0]	111	0,6	0,22	26	0,5	BIEC2-676845
CH/F WB: Wiederber.	langsam [1]/sehr langsam [2]	39	normal [0]	100	0,45	0,35	15	49	BIEC2-308928
CH/F WB: Leistung	schlecht [2]	38	gut [0]/sehr gut [0]	90	0,7	0,15	11	5	BIEC2-135609
INTERNE METHODEN-KONTROLLE									
Fuchsfarbe	Fuchs [2]	100	Braun [1], Schimmel [3] andere [2]	263	0,001	3	3	32 - 44	73 SNPs

Erläuterungen zur Tab. I.:

Angegeben werden die Wahrscheinlichkeitswerte für den SNP, der am ehesten eine Assoziation aufwies; Signifikanzniveau: $EMP2 < 0,05$, Signifikanzniveau $-\log_{10}(EMP2) > 1,3$;

Bel. = Belastung, CH = Schweiz, Chr. = Chromosom, D = Deutschland, F = Frankreich, Mb = Megabasen, Kontr. = Kontrollen, n Fälle = Anzahl Fälle, n Kontrollen = Anzahl Kontrollen, WB = Warmblut, Wiederber. = Wiederberuhigung

Publikationen

- **Gesamtgenomscan bei nicht verwandten Warmblutpferden mit chronisch obstruktiver Bronchiolitis**
C Ehrmann, J. Klukowska-Rötzler, T. Leeb, K. Fey, V. Gerber
Tierärztliche Praxis, Abstracts, InnLab-Tagung DVG, 4./5. Feb. 2011
Schattauer-Preis, 1. Platz
- **Replication and fine-mapping of a QTL for recurrent airway obstruction (RAO) in European Warmblood horses**
M. Shaksi-Niaei, J. Klukowska-Rötzler, C. Drögemüller, J. Swinburne, C. Ehrmann, D. Saftic, A. Ramseyer, V. Gerber, G. Dolf, T. Leeb
Animal Genetics 2012 (Manuskript angenommen)

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 22.02.2012

Carolin Ehrmann

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Kerstin Fey für das Vertrauen das sie mir entgegen brachte und für die gute Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für die großartige, herzliche und lehrreiche Zusammenarbeit in der Klinik für Pferde, Innere Medizin.

Ich danke Prof. Dr. Vincent Gerber der die Studie ins Leben gerufen hat für die Überlassung dieser Arbeit und für sein Vertrauen.

Prof. Dr. Tosso Leeb und Jolanta Klukowska-Rötzler vom Institut für Genetik der Vetsuisse-Fakultät Bern danke ich für die tolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung und bei allen genetischen Fragestellungen.

Ganz lieb bedanke ich mich bei meiner Freundin und Kollegin Dr. Nora Gembicki-Rebello für ihre großartige Hilfe bei allen Computerproblemen sowie in allen Lebenslagen.

Herzlichen Dank an Frau Dr. Katja Roscher für ihre tolle Unterstützung bei der Literatursuche und -verwaltung sowie für ihre professionelle Beratung.

Meinen lieben Kolleginnen Dr. Marion Lembcke, Lisa Held und Janike Forst sowie der Tierpflegerin Tatiana Schneider und dem Tierpfleger Christof Kett danke ich ganz lieb für die prima Zusammenarbeit.

Meiner Freundin Kathi Scholz danke ich von Herzen für ihre fantastische Unterstützung beim Probensammeln.

Bei Päivi Nussbaumer bedanke ich mich herzlich für das Probensammeln in der Schweiz.

Vielen Dank an alle Pferdehalter und -besitzer für die Mitwirkung an dieser Studie.

Von Herzen danke ich Andreas Trzenschiok für die liebevolle Unterstützung und Ermutigung zum Durchhalten in allen schwierigen Phasen.

Besonders lieber Dank gilt meiner Mutter Christine Ehrmann für ihre ständige liebevolle Unterstützung und Bestärkung aller meiner Ziele.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5905-7

